

ÜBER DIE FERMENTATIVE UND NICHTFERMENTATIVE
OXIDATION VON MYRICITRIN UND MYRICETIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt
von
Barbara Lang
aus Berlin

Berlin 1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ÜBER DIE FERMENTATIVE UND NICHTFERMENTATIVE OXIDATION VON MYRICITRIN UND MYRICETIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt

von

Barbara Lang
aus Berlin

Berlin 1971

1. Referent: Prof. Dr. H. Loth
2. Referent: Prof. Dr. K.-H. Frömming
3. Referent: Prof. Dr. R. Hänsel



Letzter Tag der mündlichen Prüfung: 16. 6. 1971

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit wurde im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung und unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Helmut Loth durchgeführt.

Ich danke Herrn Professor Loth für die Überlassung des Themas und für seine stete Bereitschaft zur Diskussion aller Probleme, die sich im Zusammenhang mit meiner Arbeit ergaben sowie für seine Hilfe beim Literaturstudium.

Ich möchte mich an dieser Stelle aber auch für sein Mitgefühl meinen persönlichen Problemen gegenüber aufrichtig bedanken.

Dank schulde ich auch den Direktoren des Pharmazeutischen Instituts, Herrn Professor Dr. Gerhard Schenck, Herrn Professor Dr. Fritz Eiden und Herrn Professor Dr. Hans Möhrle.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. Einleitung und Problemstellung	5
B. Allgemeiner Teil	10
I. Fermentative Oxidation	10
1. Isolierung des in der Rinde von <i>Myrica nagi</i> enthaltenen Myricitrins	10
2. Identifizierung von Myricitrin	10
3. Oxidation von Myricitrin mit Peroxidase- H_2O_2	14
4. Hydrolyse des Oxidationsansatzes	16
5. Charakterisierung des Aglykons	17
6. Auffinden der Verknüpfungsstelle	22
7. Untersuchung des glykosidischen Oxidations- produktes	27
II. Nichtfermentative Oxidation	32
1. Einleitung	32
2. Myricetinchinon	32
3. Versuche zur Darstellung stabiler Derivate des Myricetinchinons	34
4. Nichtfermentative Oxidation von Myricitrin	36
C. Elektrochemischer Teil	38
1. Einleitung	38
2. Messung der Redoxpotentiale nach der Methode von Ball, Chen u. Clark	39
3. Auswertung der Messungen	42
4. Bemerkungen	46
5. Meßergebnisse	47
6. Zusammenfassung der potentiometrischen Meßergebnisse	73
D. Diskussion	76
1. Bildungsmechanismus	76
2. Redoxpotentiale	79

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
E. Durchführung der Versuche	82
1. Allgemeine Angaben	82
2. Darstellung und Reinigung der Substanzen	84
3. Enzyme	88
4. Oxidationsversuche	88
5. Reduktionsversuche	89
6. Addition von Benzolsulfinsäure	89
E. Zusammenfassung	90
G. Literaturverzeichnis	92

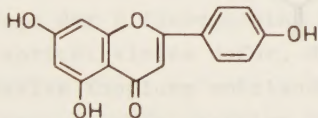
A. Einleitung und Problemstellung

Die enzymatische Oxidation, wie allgemein die Oxidation und Verknüpfung von Phenolen zu dimeren oder polymeren Verbindungen, hat in der Biochemie eine große Bedeutung erlangt. Wahrscheinlich laufen die Biosynthesewege einiger Naturstoffe, wie die der Tannine, Alkaloide oder Lignine über eine phenolische Oxidation und anschließende Dimerisierung oder Polymerisierung ab.

Eine große Gruppe von phenolischen Pflanzenstoffen bilden die Flavonoide, die eine außerordentlich weite Verbreitung im Pflanzenreich besitzen. Einige Flavonoide haben eine gewisse Bedeutung als Vorstufen der sogenannten "kondensierten Gerbstoffe"¹⁾.

Eingehende Untersuchungen auf dem Gebiet der Flavonoide haben in der letzten Zeit zur Entdeckung einer neuen Flavonoid-Klasse geführt, den Biflavonoiden. Wie der Name zeigt, handelt es sich hier um dimere Flavonoide. So sind bei den Biflavonen zwei Flavone miteinander verknüpft. Derartige Biflavone sind weit verbreitet unter den Gymnospermen, vereinzelt findet man sie aber auch bei den Angiospermen.

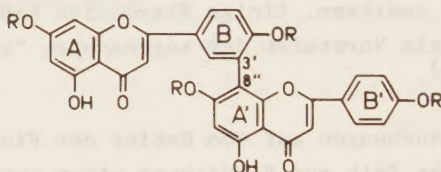
Die Struktur der natürlichen Biflavone ist sehr unterschiedlich, sie leiten sich jedoch alle von einem Grundkörper, dem Apigenin, ab.



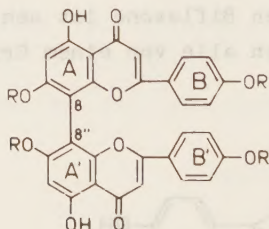
Der Grund hierfür dürfte in der Schwere von Oxidierbarkeit von Monohydroxyphenol-Derivaten gegenüber den Di- und Tri-

hydroxyverbindungen liegen, die leicht weiter oxidiert werden und zu polymeren Verbindungen führen. Die unterschiedlichen Strukturen bei den im Pflanzenreich gefundenen Biflavonen kommen durch die verschiedenen Verknüpfungsmöglichkeiten zustande.

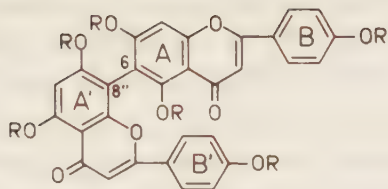
Am häufigsten findet man hier eine C-C-Verknüpfung wie bei den isomeren Amento- und Cupressuflavonen. Die Verknüpfung kann einmal zwischen dem A-Ring und B-Ring erfolgt sein wie bei der Gruppe der Amentoflavone (2).



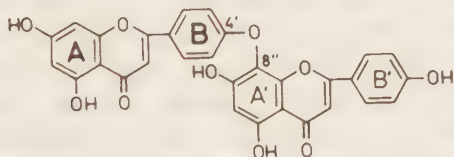
Zum anderen können auch zwei A-Ringe miteinander verknüpft sein wie bei den Cupressuflavonen (3).



Kürzlich konnten Pelter und Mitarbeiter (4) aus *Agatis palmerstonii*, *Araucariceen* ein Biflavon isolieren, das eine bisher noch nicht bekannte 6,8"-Verknüpfung der beiden A-Ringe aufweist.



Neben den dimeren Flavonen mit C-C-Verknüpfung gibt es auch aetherartig verknüpfte Biflavone, wenn ihr Vorkommen im Pflanzenreich auch geringer ist. Zu dieser Gruppe gehört das Hinokiflavon (5).



Biflavone, die durch Verknüpfung der beiden B-Ringe entstanden sind, sind in der Natur bis jetzt noch nicht aufgefunden worden.

Die Biosynthesewege der Biflavone sind bis jetzt noch nicht geklärt, jedoch spricht vieles dafür, daß sie aus zwei Flavonen durch oxidative Kupplung entstanden sind. So könnten sie also die ersten, relativ stabilen Reaktionsprodukte bei der enzymatischen Oxidation sein.

Da sich alle bisher im Pflanzenreich gefundenen Biflavone vom Apigenin ableiten, war es interessant festzustellen, ob auch andere Flavone oder Flavonole bei der enzymatischen

Oxidation Biflavone als stabile Zwischenprodukte bilden können. In diesem Zusammenhang wurde die Einwirkung von dem System Peroxidase - H_2O_2 auf einige natürlich vorkommende Flavonole untersucht (6)(7)(8).

Die Untersuchungen gaben einen Einblick in die dabei ablaufenden Reaktionsschritte und Hinweise auf die dabei entstehenden Oxidationsprodukte. So wurde festgestellt, daß das System Peroxidase - H_2O_2 bevorzugt an den Hydroxylgruppen im B-Ring angreift. Da Flavonole im allgemeinen schlecht wasserlöslich sind, wurden für die Untersuchungen die entsprechenden 3-Glykoside eingesetzt, die für enzymatische Reaktionen eine genügend große Wasserlöslichkeit aufweisen. Loth (6) und Diedrich (9) konnten für das Rutin beweisen, daß der erste Schritt in der Bildung eines Chinons liegt. Heinrichi (8) fand dasselbe für das Myricitrin. Klinge (7) konnte dagegen für das Kämpferol-3-glukosid keine Chinonbildung feststellen, sondern nahm die Bildung von Radikalen an. Die Frage nach der Art der gebildeten Oxidationsprodukte konnte nicht völlig geklärt werden. Bisher konnten noch keine definierten Oxidationsprodukte isoliert werden. Klinge (7) isolierte zwar neben polymeren Stoffen ein Produkt, das ein Dimeres des Kämpferol-3-glukosids ist, konnte aber dessen genaue Struktur nicht aufklären. Heinrichi (8) vermutete ebenfalls ein Dimeres des Myricitrins als einziges Oxidationsprodukt bei der Oxidation durch Peroxidase- H_2O_2 .

In Fortführung der Arbeit von Heinrichi (8) sollten zunächst die bisher bekannten Angaben über die Oxidation von Myricitrin durch Peroxidase- H_2O_2 überprüft werden und ein Strukturbeweis für das Oxidationsprodukt versucht werden.

Ferner sollte präparativ und auf elektrochemischem Wege der Beweis für die Bildung eines Chinons erbracht werden. Da die Redoxpotentiale derartiger Verbindungen noch nicht in der Literatur beschrieben wurden, sollten diese ermittelt werden und mit einigen Trihydroxyverbindungen sowie mit dem Rutin

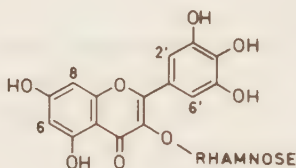
und Quercetin verglichen werden. Aufgrund dieser Untersuchungen könnten auch einige Aufschlüsse hinsichtlich der Verwendbarkeit der Flavonoide als Antioxidantien in der Lebensmittelchemie und Pharmazie gewonnen werden.

B. Allgemeiner Teil

I. Fermentative Oxidation

1. Isolierung des in der Rinde von Myrica nagi enthaltenen Myricitrin

Das für die Untersuchungen erforderliche Myricitrin = Myricetin-3-rhamnosid wurde aus der Rinde von Myrica nagi, eines in Südostasien beheimateten Baumes gewonnen.



Dieses Ausgangsmaterial wurde gewählt, weil diese Rinde - im Gegensatz zu anderen Myricitrin enthaltenden Drogen - nur dieses Flavonolglykosid enthält. Außerdem ist die Konzentration an Myricitrin relativ hoch. In der Literatur wird ein Gehalt von 4 - 5 % angegeben (10).

Die feingepulverte Rinde wurde mit Methanol bei Zimmertemperatur extrahiert. Nach dem Abpressen von nichtgelösten Stoffen und Gewebeteilen wurde der braune methanolische Extrakt unter vermindertem Druck eingeeengt. Aus dem braunen pulverförmigen Rückstand wurde durch Umkristallisieren aus Wasser eine chromatographisch einheitliche Substanz gewonnen (Fp. 195 - 196°).

2. Identifizierung von Myricitrin

Zur Identifizierung wurde Myricitrin hydrolysiert. Durch chromatographischen Vergleich mit Testsubstanzen ließen sich Rhamnose und Myricetin nachweisen. Spektroskopische Untersuchungen erbrachten ebenfalls den Beweis der Identität.

UV-Spektrum

Das in Methanol aufgenommene Spektrum zeigt über den Bereich von 220 - 420 nm zwei Absorptionsmaxima (Abb. 1)

Tab. 1: Meßwerte des Absorptionsspektrums von Myricitrin
Literaturwerte in Klammern (11)

Bande I	Bande II
$\lambda_{\text{max}} = 355 \text{ nm} (356 \text{ nm})$	$\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm} (256 \text{ nm})$
$\log \epsilon = 4,23$	$\log \epsilon = 4,29$
$E(c = 50 \text{ } \mu\text{Mol/L}, d = 1 \text{ cm}) = 0,865$	$E(c = 50 \text{ } \mu\text{Mol/L}, d = 1 \text{ cm}) = 0,98$

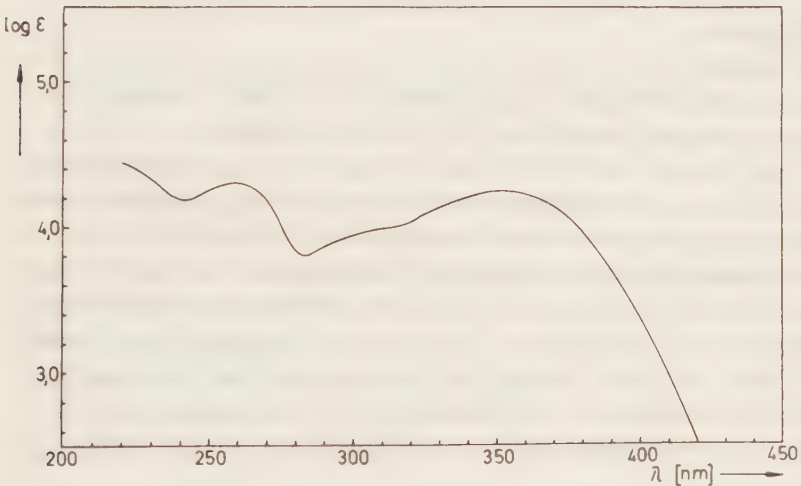
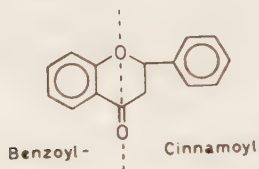


Abb. 1: Absorptionsspektrum von Myricitrin in Methanol

Bei den Flavonen wird allgemein die Absorptionsbande im Bereich von 300 - 380 nm als Bande I und die zwischen 240 - 280 nm als Bande II bezeichnet, wobei man rein empirisch die Bande I der Cinnamoylgruppierung und die Bande II der Benzoylgruppierung zuschreibt (12). Die Einführung von OH-Gruppen in den Ring B führt zu einer bathochromen Verschiebung

der Bande I, OH- oder CH_3O -Gruppen im A-Ring führen zur Rotverschiebung der Bande II. Darüber hinaus beeinflussen jedoch die B-Ring-Substituenten auch die Bande II und die Substituenten am A-Ring die Bande I.



NMR-Spektrum

Das Kernresonanzspektrum vom Myricitrin (Abb. 2) wurde in deuteriertem Methanol aufgenommen. Die beiden aromatischen A-Ring-Protonen erscheinen als Dubletts zwischen $\delta = 6,0 - 6,5$ ppm, wobei das C-6-Proton (A) bei 6,17 ppm und das C-8-Proton (B), zu niedrigerem Feld verschoben, bei 6,33 ppm erscheint ($J = 2,5$ Hz). Die Protonen des B-Ringes (C-2' und C-6') absorbieren bei noch niedrigerem Feld. Sie erscheinen als Singulett bei $\delta = 6,94$ ppm. Die Integration ergibt für jedes Dublett ein Proton und für jedes Singulett zwei Protonen. Alle übrigen Signale im Spektrum sind den Protonen der Rhamnose zuzuordnen; sie erscheinen, mit Ausnahme des C-1-Protons der Rhamnose bei $\delta = 5,31$ ppm, als breite Banden.

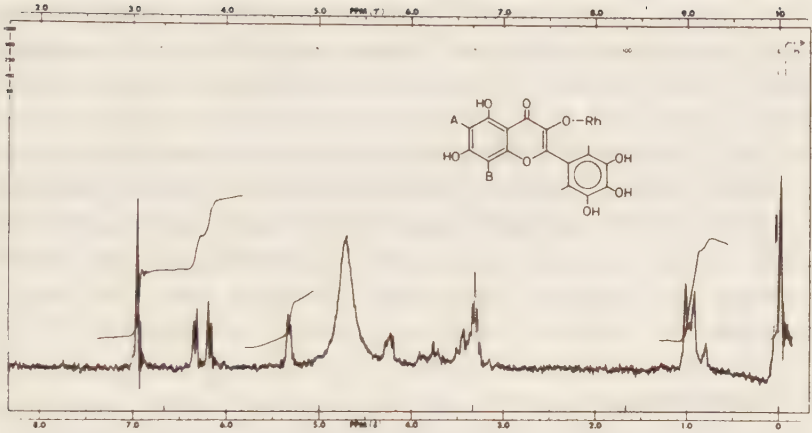


Abb. 2: NMR-Spektrum von Myricitrin in CD₃OD

IR-Spektrum

Das IR-Spektrum (Abb. 3) wurde in KBr gemessen. Im Bereich 3 000 - 3 500 cm⁻¹ zeigen sich die Hydroxylbanden. Die Carbonylbande ist als scharfe Bande bei 1 650 cm⁻¹ angezeigt. Die Absorption bei 1 600 cm⁻¹ ist nach Bellamy (13) auf den Phenylring zurückzuführen.

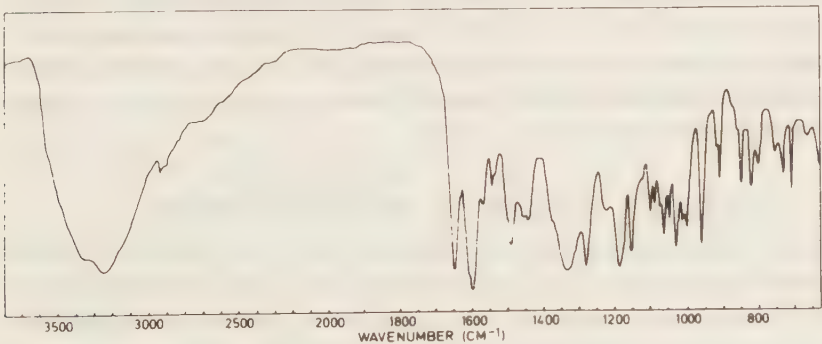


Abb. 3: IR-Spektrum des Myricitrins in KBr

3. Oxidation von Myricitrin durch Peroxidase-H₂O₂

a. Oxidationsansatz

In Anlehnung an die Arbeit von Heinrici (8) wurde Myricitrin in folgender Weise oxidiert: 1 mMol Myricitrin, in etwas Methanol gelöst, wurde mit destilliertem Wasser verdünnt. Nach Zusatz von 1 mMol H₂O₂ wurde die Reaktion mit Peroxidase gestartet. Chromatographische und spektrophotometrische Untersuchungen hatten gezeigt, daß durch eine äquimolare Menge an H₂O₂ Myricitrin innerhalb einer Stunde quantitativ oxidiert wurde und daß ein weiterer Zusatz an Oxidationsmittel keine Änderung des Spektrums hervorrief. Außerdem ließ sich chromatographisch nur ein Oxidationsprodukt nachweisen.

b. Aufarbeitung

Eine schonende Methode zur Isolierung gut wasserlöslicher Stoffe ist die Gefriertrocknung. Um eine temperaturbedingte Veränderung der Reaktionsprodukte zu vermeiden, wurde der Oxidationsansatz auf diese Weise aufgearbeitet. Das gelbe Lyophilisat wurde zur Abtrennung der Peroxidase mit Methanol aufgenommen.

c. Chromatographische Untersuchung

Um einen Überblick über die bei der Oxidation entstandenen Produkte zu gewinnen, wurde eine Lösung des Lyophilisats dünnschichtchromatographisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß sich auf unterschiedlichen Sorbentien und mit verschiedenen Fließmittelgemischen neben ganz geringen Mengen an hochmolekularen, nicht fließenden Substanzen, nur ein Produkt nachweisen ließ.

d. Versuche zur Reinigung des Oxidationsproduktes

Eine Reinigung des Oxidationsproduktes durch Kristallisation oder fraktionierte Fällung gelang nicht, deshalb wurde eine Abtrennung der Begleitstoffe mit Hilfe der Adsorptionschromatographie versucht. Für Flavonoide eignen sich besonders gut Polyamid- und Zellulosepulver. Wie sich aber heraus-

stellte, zersetzte sich das Produkt während der langen Zeit der Elution. Andere Sorbentien, wie Polyvinylpyrrolidon, Sephadex LH 20, Kieselgel und Aluminiumoxid adsorbierten das Produkt derart fest, daß keine Elution möglich war; denn es konnten weder saure noch alkalische Elutionsmittel verwendet werden. Basische Lösungsmittel kamen nicht in Betracht, weil im Alkalischen die autoxidativen Veränderungen besonders groß sind. Bei Verwendung saurer Elutionsmittel war es unmöglich, das Lösungsmittel ohne Zersetzung des Oxidationsproduktes zu entfernen.

e. UV-Spektrum

Um etwas reine Substanz zur Aufnahme eines UV-Spektrums zu gewinnen, wurde die methanolische Lösung des Lyophilisats auf Kieselgel HF₂₅₄-Platten chromatographiert. Dem Sorbens mußten 0,5 % Komplexon III zugesetzt werden, um so durch Komplexbildung des im Kieselgel vorhandenen Eisens durch Oxidation bedingte Schwanzbildungen zu verhindern.

Als günstigstes Fließmittelsystem erwies sich Butylacetat: Butanol: Eisessig: Wasser (85:15:40:20) (v/v/v/v). Nach dem Entwickeln wurde die Zone abgeschabt und mit Methanol extrahiert. Diese Lösung wurde zur Messung eingesetzt (Abb. 4).

Das so erhaltene Spektrum hat wenig Ähnlichkeit mit einem Flavonspektrum. Maxima und Minima sind nicht deutlich ausgeprägt, sie erscheinen nur als Schultern. Die Bande I ist um etwa 30 nm hypsochrom verschoben, lediglich die Bande II bei $\lambda = 258$ nm weist eine für die Flavone charakteristische Lage auf. Es muß damit gerechnet werden, daß hier, obwohl sich chromatographisch kein zweiter Stoff nachweisen ließ, eine Verunreinigung vorliegt.

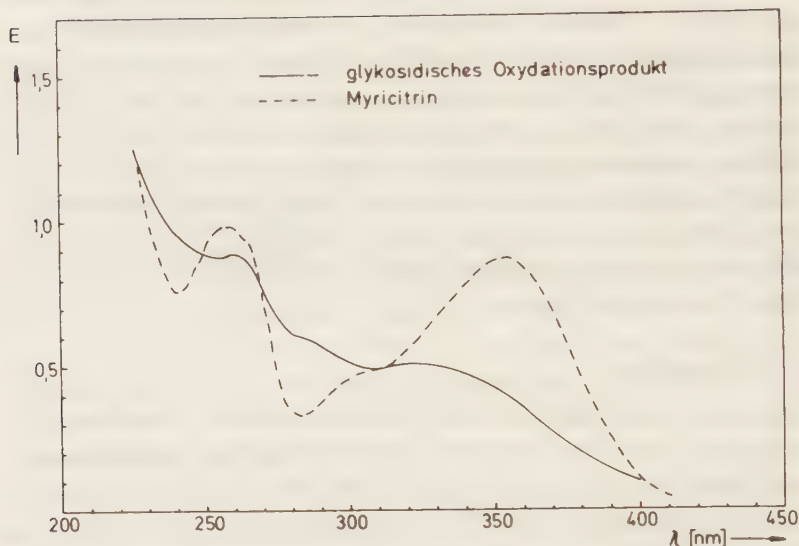


Abb. 4: Absorptionsspektren von Myricitrin (c. = 2,5 mg/100 ml) und glykosidischem Oxidationsprodukt in Methanol (c = 1 mg/100 ml)

4. Hydrolyse des Oxidationsansatzes

Da die Aglyka der Flavone gegenüber den Glykosiden eine wesentlich geringere Wasserlöslichkeit aufweisen und besser kristallisieren, wurde der Ansatz mit 2 proz. Schwefelsäure hydrolysiert. Es schied sich dabei nach dem Erkalten ein kristallines, braunes Produkt ab. Aus der wässrigen Lösung konnte Rhamnose chromatographisch nachgewiesen werden.

Dünnschichtchromatographisch ließen sich drei Produkte nachweisen, von denen zwei Produkte nur in sehr geringen Mengen vorlagen. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung erfolgte auf Kieselgel HF₂₅₄-Platten, die einen Komplexbildnersatz enthielten. Fließmittel: Aethylacetat: Methylaethylketon: Ameisensäure: Wasser (50:30:10:10) (v/v/v/v). Nach dem Ansprühen mit Aluminiumchlorid-Lösung zeigte das in großen Mengen vorliegende Produkt eine gelbe Fluoreszenz, während

die beiden anderen Produkte nicht fluoreszierten. Im Rf-Wert unterschieden sie sich dagegen kaum.

Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Wasser konnte das Hauptprodukt als hellgelbe Nadelchen isoliert werden. Das Produkt war chromatographisch rein.

5. Charakterisierung des Aglykons

Ein Schmelzpunkt konnte für diese Substanz nicht ermittelt werden; oberhalb von 340°C trat Zersetzung ein.

a. Molekulargewicht - Massenspektrum

Da das Aglykon in den für die osmotische Bestimmung günstigen Lösungsmitteln nicht ausreichend löslich war oder sich darin zersetzte, blieb nur noch die Möglichkeit, durch ein Massenspektrum der Verbindung Angaben über das Molekulargewicht zu machen.

Durch das Auftreten eines Molekülions M^{+} mit der Massenzahl 634 konnte das Molekulargewicht festgelegt werden. Danach ist das Aglykon des Oxidationsproduktes ein Dimeres des Myricetins.

Im Spektrum (Abb. 5) wurde ein Schlüsselbruchstück bei m/e 317 festgestellt, das durch Spaltung der dimeren Verbindung in zwei monomere Myricetinionen entstanden sein könnte.

Durch Einfangen eines Protons kann sich das Bruchstück 318 gebildet haben. Peaks bei m/e 616 und m/e 606 deuten auf die Eliminierung von Wasser und CO hin, die man auch beim Myricetin (Abb. 6) findet (m/e 300 und m/e 290).

Beim Myricetin entstehen ferner die für die Flavonole charakteristischen Bruchstücke (14). Die hierbei dominierenden Fragmentierungsreaktionen führen zum Bruchstück m/e 153.

Typisch ist weiterhin ein Bruchstück bei m/e 136, entstanden aus $\frac{M-18-28}{2}$.

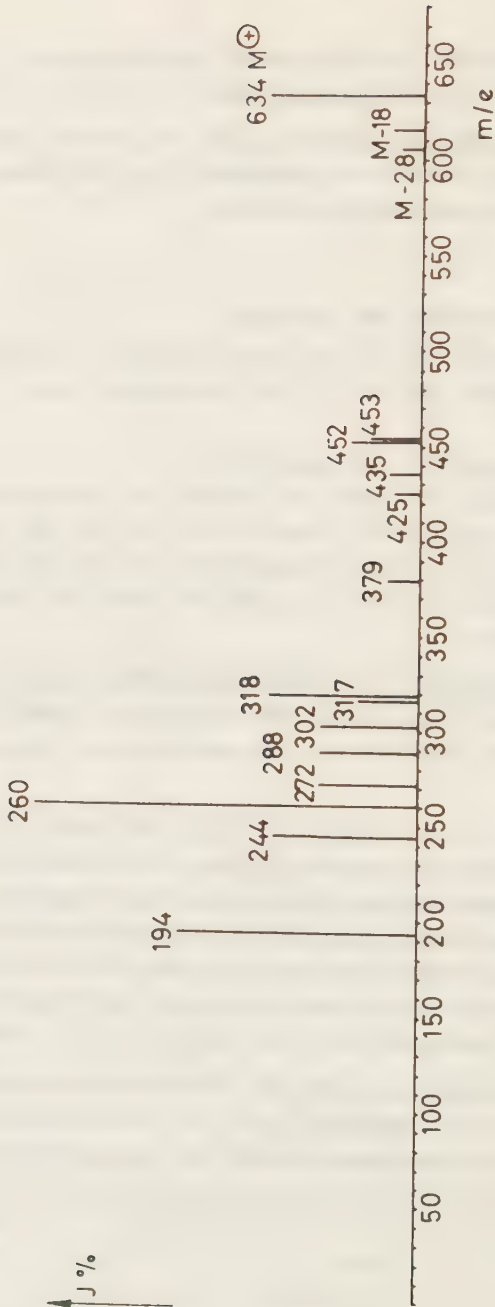
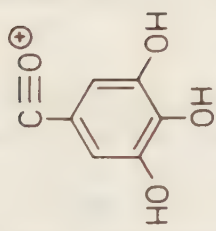


Abb. 5: Ausschnitt aus dem Massenspektrum vom dimeren Myricetin $t = 340^{\circ}\text{C}$ (oberhalb $m/e = 180$)



oder

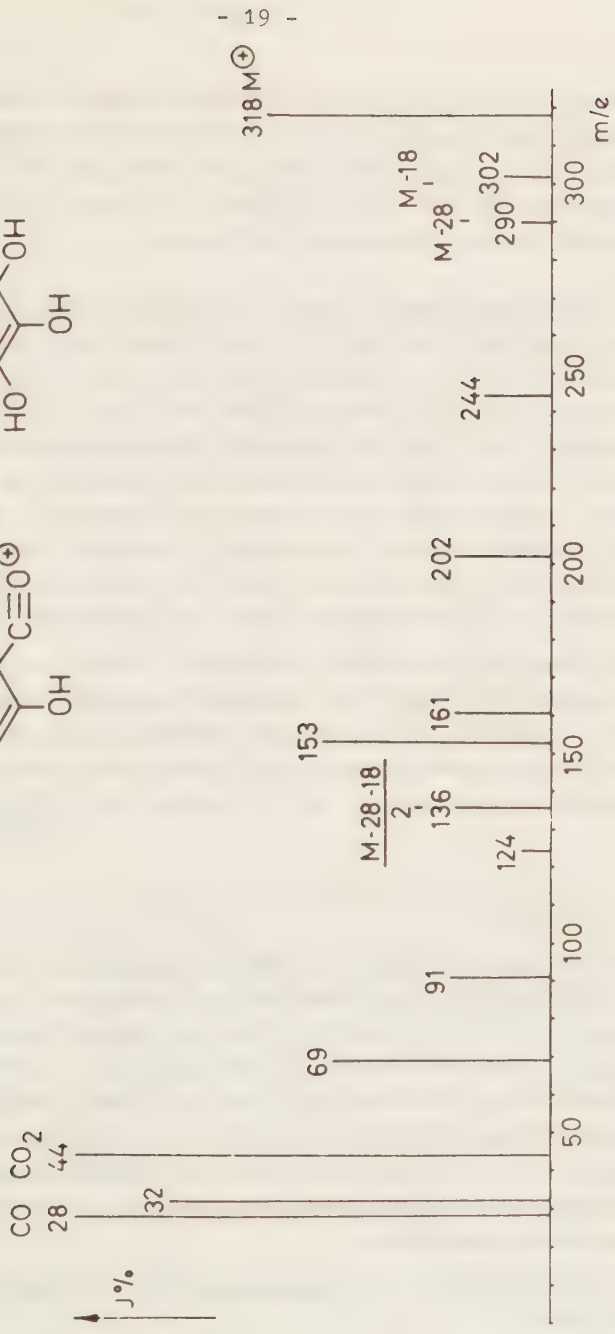
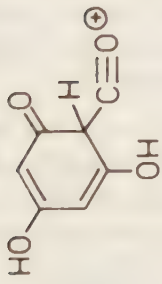


Abb. 6: Massenspektrum von Myricetin

Setzt man für die dimere Substanz ähnliche Fragmentierungsreaktionen voraus wie für das Myricetin, so müßten im Spektrum Peaks erscheinen, deren m/e -Werte bei 304 ($2 \times 153 - 2$) oder bei 248 ($((2 \times 153 - 28) - 2)$) liegen. Derartige Bruchstücke wurden jedoch nicht gefunden.

b. Verhalten gegen Säuren, Aluminiumchlorid und Alkalien

Im chemischen Verhalten ist das dimere Myricetin dem Myricetin sehr ähnlich. Versetzt man Lösungen der Substanz mit Säuren, so tritt Farbvertiefung ein. Mit Aluminiumchlorid-Lösung bildet sich ein schwach gelbfluoreszierender Komplex; der Aluminium-Myricetin-Komplex fluoresziert gelbgrün. Versetzt man Lösungen der Substanz mit Ammoniak, so ändert sich die Farbe von gelb über violett, grün nach braun. Ähnlich starke Verfärbungen zeigt auch das Myricetin, eine Eigenschaft, die dem Pyrogallol-Kern zuzuschreiben ist.

In Lösung ist das dimere Myricetin, ähnlich wie das Myricetin, sehr instabil, die Autoxidation wurde jedoch nicht weiter untersucht. Erste meßbare Veränderungen im Spektrum traten bereits nach 10stündigem Stehen einer methanolischen Lösung auf.

UV-Spektrum

Das UV-Spektrum wurde in Methanol aufgenommen (Abb. 7). Die Unterschiede zwischen der monomeren und dimeren Substanz sind relativ gering. Für das dimere Myricetin hat die Bande II mit dem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 255$ nm annähernd dieselbe Lage wie für das Myricetin. Der ϵ -Wert ist hier beim dimeren Myricetin allerdings fast doppelt so groß. Die Bande I der dimeren Verbindung ist gegenüber dem Myricetin um etwa 10 nm hypsochrom verschoben; die ϵ -Werte sind hier annähernd identisch.

Die Werte für beide Verbindungen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

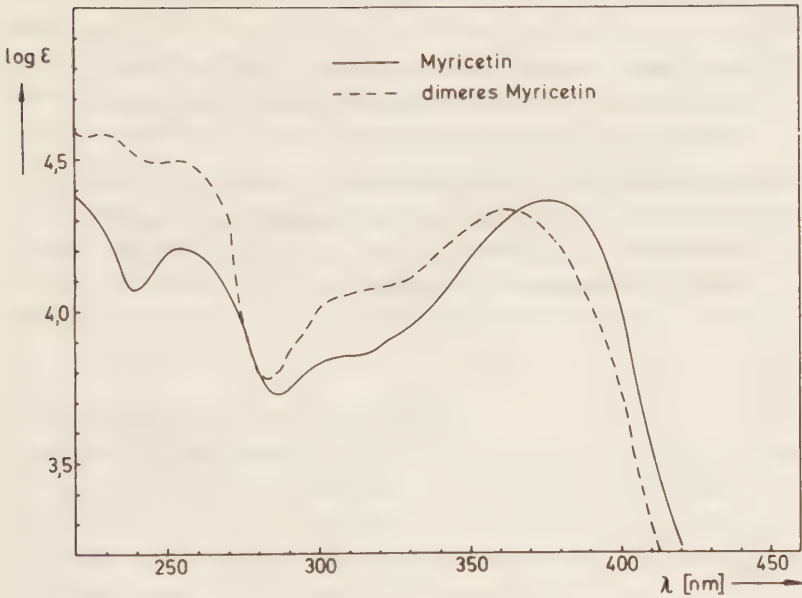


Abb. 7: UV-Spektren von Myricetin und dimerem Myricetin in Methanol

Tab. 2: Meßwerte der UV-Spektren von Myricetin und dimerem Myricetin (in Methanol)

	Myricetin	dimeres Myricetin	Myricetin	dimeres Myricetin
Maxima λ [nm]	375	362	253	255
ϵ [L/Mol·cm]	$2,3 \cdot 10^4$	$2,15 \cdot 10^4$	$1,68 \cdot 10^4$	$3,15 \cdot 10^4$
E [c=50μMol/L] d=1cm	1,15	1,05	0,84	1,25
Minima λ [nm]	239	245	287	283
Schultern λ [nm]	305	305		

IR-Spektrum

Das IR-Spektrum (Abb. 8) wurde in KBr aufgenommen. Es zeigt:

- 1) eine sehr breite Bande zwischen $2\,500\text{ cm}^{-1}$ und $3\,700\text{ cm}^{-1}$. In diesem Bereich liegen die chelatisierten und freien OH-Gruppen;
- 2) ein intensives Signal zwischen $1\,600$ und $1\,670\text{ cm}^{-1}$, das dreimal aufgespalten ist, wobei das Signal bei $1\,660\text{ cm}^{-1}$ der Carbonylbande und das bei $1\,600\text{ cm}^{-1}$ der Aromatenbande zuzuordnen ist.

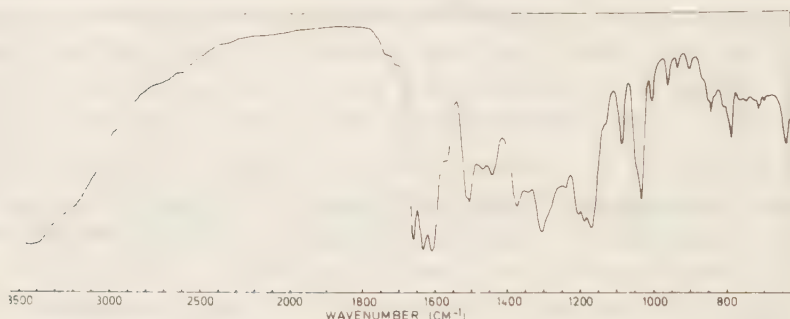


Abb. 8: IR-Spektrum des dimeren Produkts (0,5 mg in 300 mg KBr)

6. Auffinden der Verknüpfungsstelle

Nachdem bewiesen war, daß das Aglykon des Oxidationsproduktes ein Dimeres des Myricetins ist, stellte sich die Frage nach der Art und Stelle der Verknüpfung, da grundsätzlich mehrere isomere Formen möglich sind. Eine Aufklärung sollte hier das NMR-Spektrum bringen.

a. Methylierung

Die für die NMR-Spektroskopie von Flavonoiden empfohlene Trimethylsilylierung (15) erwies sich als ungeeignet, da keine einheitlichen Produkte entstanden. Deshalb wurde ver-

sucht, ein anderes, für die Aufnahme von NMR-Spektren geeignetes Derivat herzustellen. Hierfür wurde die Methylierung gewählt. Eine Methylierung in Aceton und Kaliumcarbonat mit Dimethylsulfat erwies sich als ungünstig, da das Oxidationsprodukt in Aceton nicht genügend löslich ist. Deshalb wurde zuvor in methanolische Lösung mit Diazomethan methyliert.

Das erhaltene Produkt wurde dann ohne weitere Reinigung anschließend mit Dimethylsulfat in Aceton und Kaliumcarbonat solange nachmethyliert, bis mit Eisen(III)-chlorid keine Blaufärbung mehr auftrat. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Aethanol wurde ein permethyliertes Produkt erhalten ($F_p = 231^{\circ} \text{C}$).

b. Chromatographische Untersuchung

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung erfolgte auf Kieselgel GF-Platten, Fließmittel: Chloroform: Aethylacetat: Ameisensäure (5:4:1) (v/v/v). Die Flecken wurden beim Betrachten im kurzwelligen UV-Licht (254 nm) sichtbar. Die Substanz erwies sich danach als einheitlich.

c. UV- und IR-Spektrum

Das UV-Spektrum wurde in Methanol aufgenommen (Abb. 9). Es zeigt gegenüber dem Spektrum der nichtmethylierten Substanz (s. Abb. 7) keine wesentlichen Veränderungen. Die Maxima und Minima sind nur hypsochrom verschoben.

Beim IR-Spektrum (Abb. 10) fehlt die breite Hydroxylbande bei 3500 cm^{-1} , dafür treten bei 3000 cm^{-1} Banden auf, die der Absorption der Methylgruppen zuzuschreiben sind. Die Carbonylbande erscheint unverändert bei 1650 cm^{-1} .

d. NMR-Spektrum

Das Kernresonanzspektrum vom permethylierten Oxidationsprodukt wurde mit einem Spektrometer Varian A 60 A in deuteriertem Chloroform aufgenommen. Zum Vergleich wurde zusätzlich das NMR-Spektrum vom Hexamethyläther des Myrecitins aufgenommen (Abb. 11 und 12).

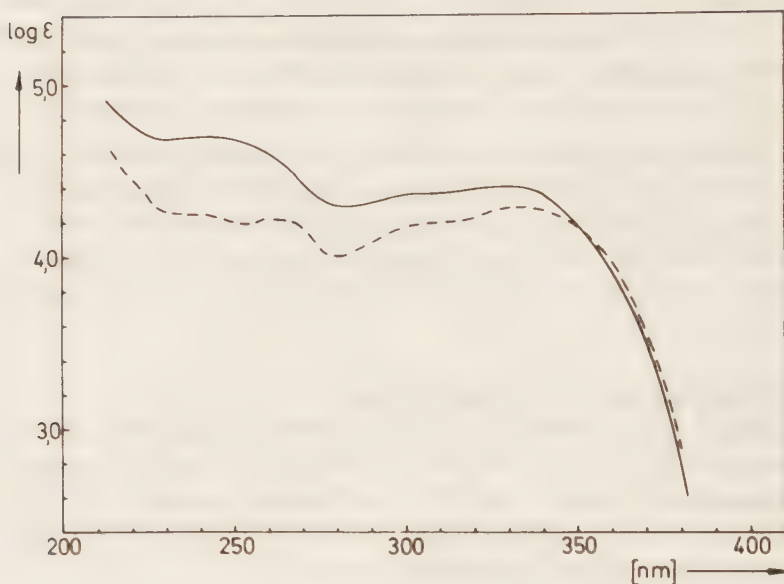


Abb. 9: Absorptionsspektren von Myricetinhexamethyläther (---) und permethyliertem Oxidationsprodukt (—) in Methanol

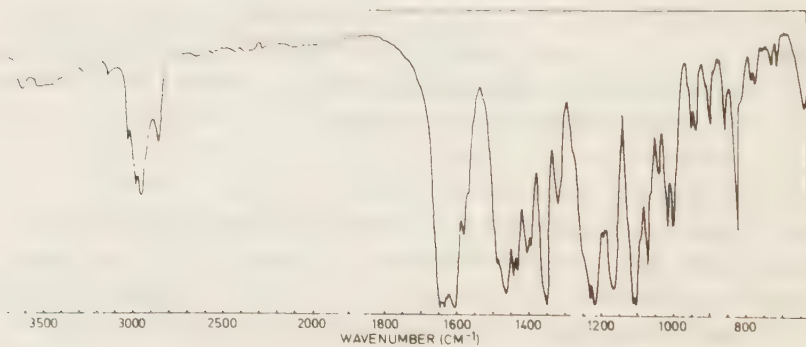


Abb. 10: IR-Spektrum des permethylierten dimeren Produkts in KBr

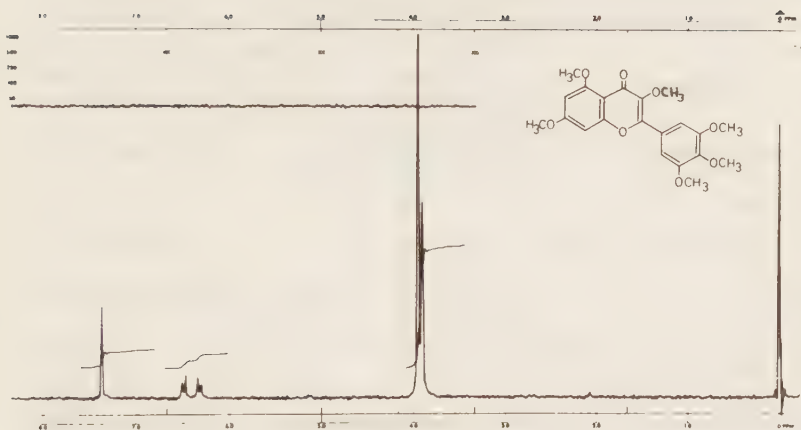


Abb. 11: NMR-Spektrum von Myricetinhexamethyläther in CDCl₃

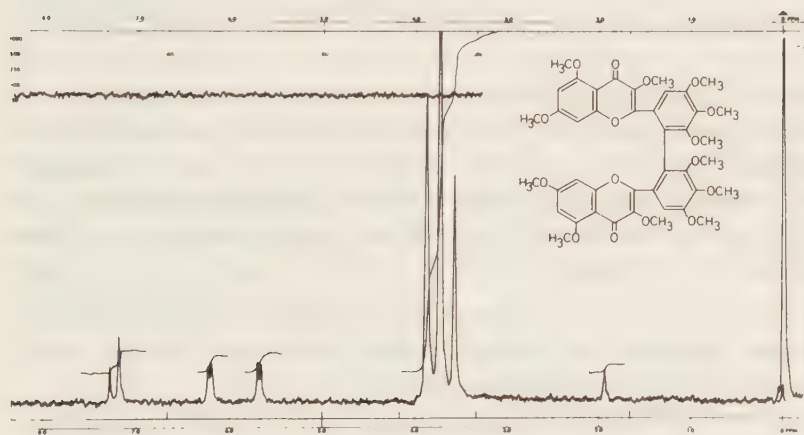


Abb. 12: NMR-Spektrum von permethylierten, dimeren Produkten in CDCl₃

Die Meßergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tab. 3: Chemische Verschiebungen δ (ppm) der Protonen von permethyliertem Oxidationsprodukt und Myricetinhexamethyläther

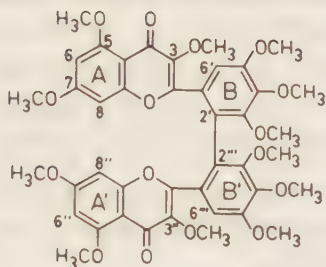
Protonen	permethyliertes Oxidationsprodukt	Myricetinhexamethyläther
H-6 bzw. H-6"	5,68 ppm (d)	6,33 ppm (d)
H-8 bzw. H-8"	6,22 ppm (d)	6,49 ppm (d)
H-2'; H-6' bzw. H-2''; H-6''	7,19 ppm (s)	7,37 ppm (s)
-O-CH ₃	3,87; 3,73; 3,57 ppm	3,95; 3,92 ppm (s)

s = Singulett d = Dublett

Auffallend ist, daß bei der methylierten dimeren Verbindung im Vergleich zum Myricetinhexamethyläther alle Protonen zum höheren Feld verschoben sind. Die A-Ring- bzw. A'-Ring-Protonen erscheinen hier als Dubletts ($J = 2$ Hz) bei $\delta = 5,68$ für H-6 und H-6" und bei $\delta = 6,22$ ppm für H-8 und H-8", die B-Ring-Protonen als Singulett bei $\delta = 7,19$ ppm. Die Integration ergibt für die aromatischen Protonen ein Verhältnis von 1:1:1.

Vergleicht man das Spektrum des Myricetinhexamethyläthers damit, so ergibt sich hier aus der Integration für die aromatischen Protonen ein Verhältnis von 2:1:1, wobei die beiden A-Ring-Protonen H-6 bei $\delta = 6,33$ ppm und H-8 bei $\delta = 6,49$ ppm erscheinen und die beiden B-Ring-Protonen als Singulett bei 7,37 ppm.

Es ist also bei der Dimerisierung jeweils 1 Proton des B-Ringes verschwunden. Daraus ergibt sich dann für die methylierte Verbindung folgende Struktur:



Ferner geben sich im NMR-Spektrum 12 Methoxylgruppen zu erkennen. Der Peak bei $\delta = 3,57$ ppm enthält die beiden Methoxylgruppen am C-3 und C-3' mit der größten Abschirmung, dann folgen die 6 Methoxylgruppen des Seitenringes bei $\delta = 3,73$ ppm. Die 4 Methoxylgruppen der A-Ringe erscheinen bei 3,85 ppm, sie weisen die geringste Abschirmung auf.

Zusammenfassung und Ergebnis

Es wurde festgestellt, daß bei der enzymatischen Oxidation von Myricitrin mit Peroxidase- H_2O_2 ein Produkt entstand, bei dessen Hydrolyse mit Schwefelsäure in größeren Mengen eine Substanz anfiel, die ein Dimeres des Myricetins darstellt, wobei die Dimerisierung im Seitenring am C-Atom 2' eingetreten ist. Es handelt sich bei der Substanz also um das 2'2''-Bimyriceitin (= 3,3', 3'', 3'', 4', 4'', 5,5', 5'', 5'', 7, 7'', dodecahydroxybiflavin-2', 2'').

7. Untersuchung des glykosidischen Oxidationsproduktes

Nachdem bewiesen war, daß das Aglykon ein Dimeres des Myricetin ist, stellte sich die Frage nach der Struktur des glykosidischen Oxidationsproduktes. Da das UV-Spektrum des glykosidischen Oxidationsproduktes sehr wenig Ähnlichkeit mit

dem des Myricitrins aufwies - gewöhnlich unterscheiden sich monomere und dimere Substanzen kaum im UV-Spektrum -, blieben uns zwei Möglichkeiten für eine Erklärung:

- 1) Das glykosidische Oxidationsprodukt hat eine andere Struktur als das freie Aglykon. Denkbar wäre eine Umlagerung während der Hydrolyse mit Schwefelsäure.
- 2) Bei dem isolierten Produkt handelt es sich nicht um eine einheitliche Substanz, sondern um ein Gemisch von isomeren Formen.

a. Glykosid-Spaltung mit Bortribromid

Ziel dieser Untersuchung war es, eine möglichst schonende Abspaltung der Rhamnose zu erreichen. 1963 wurde Bortribromid als kräftiges Entmethylierungsmittel für aromatische Äther zur Darstellung empfindlicher Phenole eingesetzt (16). In Anlehnung an diese Arbeit versuchten wir, mit Bortribromid Glykoside zu spalten. Vorteil dieser Methode ist, daß die Reaktion bei niedrigen Temperaturen abläuft; nachteilig erwiesen sich die von den Autoren empfohlenen Lösungsmittel Pentan und Methylenchlorid, da die Flavonglykoside darin nicht löslich waren. Deshalb mußten Reaktionszeiten von 48 Stunden hingenommen werden. Nach Abtrennen des Lösungsmittels und des Überschusses an Bortribromid wurde das Produkt chromatographiert (S.B.I.4.). D.c. ließen sich die gleichen Produkte in etwa dem gleichen Mengenverhältnis nachweisen wie bei der schwefelsauren Hydrolyse. Das Hauptprodukt wurde wiederum durch mehrfaches Umkristallisieren aus Wasser isoliert. Es erwies sich nach spektroskopischen Untersuchungen als völlig identisch mit dem dimeren Myricetin.

b. Enzymatische Hydrolyse mit Cellulase

Abschließend sollte versucht werden, das Glykosid enzymatisch zu hydrolysieren. Alle natürlich vorkommenden Flavonoid-3-Rhamnoside sind α -L-Rhamnoside, sie benötigen folglich für die Hydrolyse Fermente, die α -glykosidische Bindungen zu spalten vermögen. Am Myricitrin wurden einige im

Handel befindliche Fermentpräparate auf ihre Wirksamkeit hin geprüft. Das von H. Schwabe (17) für die Hydrolyse von Vitisin-4'-Rhamnosid verwendete Enzympräparat Cellulase (2000 E/g) von der Fa. Merck - eine β -Glykosidase - erwies sich danach als am wirksamsten. Cellulase ist kein einheitliches Enzympräparat, und sicher sind es die Verunreinigungen an anderen glykosidspaltenden Enzymen, die hier die Hydrolyse bewirken (18). Deshalb mußten für die Versuche relativ große Mengen an Cellulose eingesetzt werden.

Die für das Myricitrin ermittelten günstigen Bedingungen wurden auf die enzymatische Hydrolyse des Oxidationsproduktes übertragen. Um störende Begleitstoffe zu entfernen, wurde der Ansatz nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden mit wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt. Diese Lösung wurde auf Kieselgel HF-Platten mit einem Komplexonzusatz chromatographiert. Fließmittel: Aethylacetat:Methyläthylketon: Ameisensäure:Wasser (5:3:1:1) (v/v/v/v).

Es zeigten sich auf dem Chromatogramm mindestens 5 verschiedene Substanzen, die teilweise nicht scharf voneinander getrennt liefen. Ein Fleck war mit dem nicht umgesetzten glykosidischen Produkt identisch; es ließ sich jedoch kein 2',2''-Bimyrictin nachweisen. Bei einer Reaktionsdauer von 24 Stunden und einer Temperatur von 30° C können hier offensichtlich derartig viele Sekundärreaktionen auftreten, daß man nicht entscheiden kann, ob die Produkte primär entstanden sind oder Umwandlungsprodukte sind, zumal auch kein reines Enzympräparat vorlag. Da kein geeignetes Ferment erhältlich war, das eine größere Spezifität und Aktivität besaß, konnte dieses Problem nicht gelöst werden.

c. Versuche zur Darstellung glykosidischer Derivate

In der Annahme, daß es sich bei dem glykosidischen Oxidationsprodukt um ein Gemisch von isomeren Substanzen handelt, die chromatographisch nicht aufzutrennen sind, sollte versucht werden, über die Darstellung von Derivaten ein Produkt zu isolieren, dem die Struktur eines 2'2''-Biflavonol in glykosidischer Form zukommt.

Acetylierung

Die Acetylierung wurde in Acetanhydrid mit wasserfreiem Natriumacetat als basischem Katalysator vorgenommen. Der Reaktionsansatz färbte sich während der Acetylierung beim Erwärmen braunschwarz. Nach der Hydrolyse des überschüssigen Acetanhydrids setzte sich ein schwarzes teeriges Produkt ab. Eine Acetylierung bei Zimmertemperatur war nicht quantitativ, es entstanden mehrere Reaktionsprodukte, die nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung alle eine positive Eisenchlorid-Reaktion gaben. Eine Acetylierung durch saure Katalyse konnte nicht angewendet werden, weil das Glykosid während der Acetylierung hydrolysiert wurde, wie eine Untersuchung am Myricitrin zeigte, wo das Myricetinhexaacetat entstand.

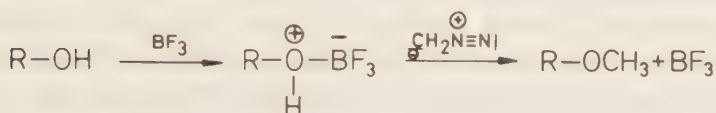
Trimethylsilylierung

Die Trimethylsilylierung sollte nach der Methode von Marbry, Kagan und Rösler (15) durchgeführt werden. Als der Versuch gemacht wurde, die Substanz in wasserfreiem Pyridin zu lösen, färbte sich der Ansatz dunkelbraun; die Farbe verschwand auch nicht, nachdem Trimethylsilylchlorid und Hexamethyldisilazan zugesetzt und der Ansatz erwärmt wurde. Auch ein Begasen mit Reinstickstoff vor und während der Reaktion brachte keine Änderung. Das NMR-Spektrum des isolierten Produktes zeigte dann auch, daß sich das Produkt zersetzt hatte.

Methylierung

Am Myricitrin wurden einige Methylierungsverfahren für die Darstellung permethylierter glykosidischer Substanzen auf ihre Verwendbarkeit hin geprüft. Das von Kuhn und anderen (19) angewendete Syntheseprinzip mit Methyljodid in Gegenwart von Silberoxid lieferte eine Reihe verschiedener Produkte, wobei auch Kernmethylierungen nicht ausgeschlossen werden konnten. Am erfolgreichsten war für das Myricitrin eine Methylierung mit Diazomethan in Gegenwart von Borfluorid (20). Obwohl Alkohole allein nicht mit Diazomethan reagieren, gelingt doch eine quantitative Methylierung mit

diesem Reagenz, wenn man Bortrifluorid als Katalysator hinzusetzt. Bortrifluorid als Lewisäure bewirkt durch Anlagerung eine Positivierung des Sauerstoffs und macht eine Reaktion mit Diazomethan möglich.



Durch zweimaliges Umsetzen ohne Bortrifluorid-Katalyse wurden vorerst die phenolischen Gruppen methyliert. Anschließend wurde nochmals mit Diazomethan unter Zusatz katalytischer Mengen Bortrifluorid der Zuckeranteil methyliert. Diese Methode führt beim Myricitrin zu einem einheitlichen, aber öligen, nicht kristallisierendem Produkt, bei dessen Hydrolyse mit Schwefelsäure das 3-Hydroxy-3',4',5',5',7-pentamethoxyflavon entstand.

Diese Methode wurde auch für die Methylierung des glykosidischen Oxidationsproduktes angewendet, da zu erwarten war, daß die Methylierung quantitativ verläuft. Aus den Reaktionsansätzen ließen sich aber eine Vielzahl von Produkten chromatographisch nachweisen, die sich selbst d.c. nicht gut auftrennen ließen. Auch die Hydrolyse mit Schwefelsäure führte zu keinen besser trennbaren Produkten. Kristallisationsversuche verliefen ebenfalls negativ.

Zusammenfassung und Ergebnis

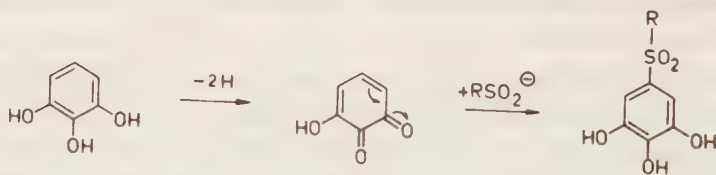
Da keine Unterschiede in den Produkten zwischen der schwefelsauren Hydrolyse und Bortribromid bestanden, kann man annehmen, daß keine Umlagerung beim Erwärmen mit Schwefelsäure eingetreten ist. Ferner lassen die Ergebnisse der Methylierung, die zu einer Vielzahl von Produkten führte, die Frage offen, ob erst beim Methylieren verschiedene Produkte entstanden sind oder von vornherein vorlagen.

II. Nichtfermentative Oxidation

1. Einleitung

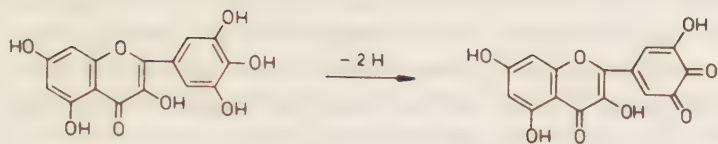
Ausgangspunkt für diesen Teil unserer Untersuchungen war die Suche nach einem instabilen Zwischenprodukt, das sich intermediär bei der Oxidation bildet und das schließlich zu dimeren bzw. polymeren Produkten führt. Myricetin wie auch dessen 3-Rhamnosid können als Derivate des Pyrogallols aufgefaßt werden. Theoretisch ist bei ihnen analog zum Pyrogallol die Bildung eines 3-Hydroxy-o-benzochinon-Derivates möglich.

Im Verlauf ihrer Arbeiten über den Bildungsmechanismus des Purpurgallins haben Horner und andere (21, 22) festgestellt, daß sich bei der Dehydrierung von Pyrogallol zwischenzeitlich das 3-Hydroxy-o-benzochinon bildet. Die Bildung dieses sehr instabilen Produktes haben sie damit bewiesen, daß sie durch Addition von Benzolsulfinsäure an das naszierende Chinon das Sulfon erhielten.



2. Myricetinchinon = 3-Hydroxy-5,3',5',7'-trihydroxychromonyl-(2')-benzochinon (1, 2)

In Anlehnung an die Arbeiten von Willstätter und Pfannenstiel (23), die das in Wasser recht unbeständige o-Benzochinon durch Oxidation von Brenzcatechin mit Silberoxid in absoluten Äther darstellten, sollte auf diese Weise das Myricetinchinon dargestellt werden.



Bei der Reaktion entstand eine dunkelrote Lösung. Die gleiche rote Farbe tritt auch auf, wenn man Myricetin in einer Mischung aus Wasser und organischen Lösungsmitteln oxidiert und als Oxidationsmittel, z. B. Kaliumjodat, Ce(IV)-sulfat oder auch Peroxidase-H₂O₂, verwendet; jedoch verschwindet in diesen Lösungsmittelgemischen die rote Farbe wesentlich schneller.

Zur präparativen Darstellung von Myricetinchinon wurde deshalb in aetherischer Lösung mit Silberoxid in Gegenwart von trockenem Natriumsulfat oxidiert. Aus dem Reaktionsansatz konnte durch Ausfällen mit Petroläther und nach längerem Stehen bei -40° C eine schwarze Substanz isoliert werden. Löste man die Substanz erneut in organischen Lösungsmitteln, so erhielt man wiederum eine rote Lösung; nach einiger Zeit ging die Farbe jedoch in ein orangebraun über.

UV-Spektrum

Um die Existenz eines Myricetinchinons nachzuweisen, wurde ein Absorptionsspektrum der Verbindung aufgenommen. O-Chinone sind meist rot gefärbt und besitzen eine Absorptionsbande um 550 nm (24). In diesem Bereich wäre folglich eine Absorption des Myricetinchinons zu erwarten.

Das Spektrum des Myricetinchinons wurde aus dem Filtrat des Oxidationsansatzes aufgenommen. Zur Messung wurde das Filtrat im Verhältnis 1:200 mit absoluten Äther verdünnt.

Das Spektrum (Abb. 13) besitzt drei Absorptionsmaxima: bei $\lambda = 510$ nm, $\lambda = 375$ nm und $\lambda = 252$ nm. Die Absorptionsbande

bei 510 nm muß einer o-chinoiden Struktur zugeschrieben werden. Über den Bereich $\lambda < 400$ nm kann man kaum etwas aussagen, weil die Reaktionslösung nicht umgesetztes Myricetin enthält. Die beiden Absorptionsmaxima bei 375 nm und 252 nm sind ein sicherer Beweis dafür, denn bei diesen Wellenlängen liegen die Absorptionsmaxima des Myricetin.

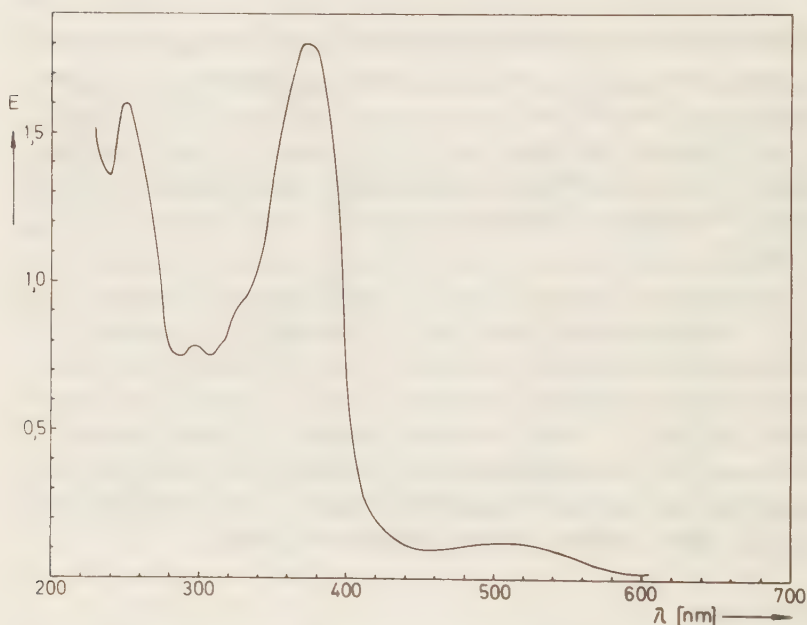


Abb. 13: Absorptionsspektrum von Myricetin nach der Oxidation der gesättigten Lösung in Äther mit Ag_2O
Verdünnung 1:200

3. Versuche zur Darstellung stabiler Derivate des Myricetinchinons

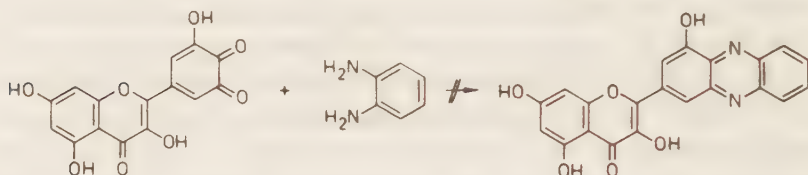
Nach Hinsberg und Himmelschein (25) versuchten wir, das gebildete Chinon mit Benzolsulfinsäure in die entsprechende Additionsverbindung zu überführen. Dies gelang aber weder mit dem isolierten Produkt noch durch Abfangen des in der Reaktionslösung mit Kaliumjodat intermediär gebildeten

Chinons. Beim Zusatz von Benzlsulfinsäure entfärbte sich die Lösung nicht, sondern verfärbte sich nur nach einiger Zeit rötlich-braun. Um festzustellen, ob sich überhaupt Benzolsulfinsäure angelagert hatte, wurde parallel zum Ansatz mit Benzolsulfinsäure die Reaktion ohne dieses Agens durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden jeweils nach einer halben Stunde in Wasser gegossen. Zur Entfernung des überschüssigen Oxidationsmittels wurde mit Natriumbisulfit versetzt und anschließend mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Einengen der Lösung wurde der Rückstand in Aethanol aufgenommen und chromatographiert. Auf dem Chromatogramm waren mehrere Flecken sichtbar, unter anderem Myricetin und dimeres Myricetin, jedoch konnte bei dem Ansatz mit Benzolsulfinsäure kein zusätzliches Produkt entdeckt werden. Wir mußten deshalb annehmen, daß entweder keine Benzolsulfinsäure angelagert worden ist, oder daß das Additionsprodukt in so geringen Mengen vorlag, daß es chromatographisch nicht mehr nachweisbar war.

Die Vermutung, daß sich eventuell gar keine Benzolsulfinsäure angelagert hat, kann man damit rechtfertigen, daß die 2'- bzw. 5'-Stellung im Myricetinchinon wenig geeignet für eine Benzolsulfinsäureaddition ist. L. Horner erhielt durch Addition von Benzolsulfinsäure an Pyrogallol 5-Benzolsulfonylpyrogallol (21). Die Benzolsulfinsäure-Addition ist in der Regel eine 1,4-Addition. Im Falle des Myricetinchinons müßte sie jedoch unter Einbeziehung des Sauerstoffes erfolgen, da die 4-Stellung besetzt ist. Das System weicht aber nicht aus, deshalb ist die Addition von Benzolsulfinsäure unmöglich oder immerhin sehr erschwert.

In der Annahme, daß die Additionsreaktionen aus sterischen Gründen verhindert werden, wurde noch die Addition von Cystein als weniger sperriges Molekül versucht. Roberts gelang es, an das in situ erzeugte Catechinchinon Cystein zum 5'-Cysteinylcatechin anzulagern und damit die Bildung von Catechinchinon zu beweisen (26). Aber auch diese Reaktion führte zu keinem Erfolg, so daß man annehmen muß, daß die Dimerisierung weitaus schneller abläuft als die Anlagerung eines anderen Stoffes.

Weiterhin wurde versucht, ein Kondensationsprodukt von Myricetinchinon und o-Phenylendiamin zum Phenazinderivat nach Teuber und Staiger (24) zu erhalten.



Das Ergebnis war auch in diesem Fall negativ. Offensichtlich werden zur Kondensation längere Reaktionszeiten benötigt; wegen der geringen Beständigkeit des Chinons ist dies aber äußerst ungünstig.

4. Nichtfermentative Oxidation von Myricitrin

Analog zum Myricetin wurde versucht, Myricitrin nach Willstätter und Pfannenstiel mit Ag_2O zu oxidieren. Hierbei gab es keine Reaktion. Mit Kaliumjodat, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ bzw. Ce(IV) -Salzen trat in wässrig-organischen Lösungsmitteln anfangs eine rotbraune Färbung auf, die aber in Bruchteilen von Sekunden in eine Gelbfärbung überging, bevor Benzolsulfinsäure zugesetzt wurde. Ein Produkt, das ein Phenylsulfonylmyricitrin darstellt, konnte nicht isoliert werden.

Loth (6) und Heinrich (8) hatten für Rutin und Myricitrin die Bildung von Rutin- bzw. Myricitrinchinon bei der fermentativen Oxidation spektralphotometrisch nachgewiesen. Sie reduzierten das intermediär gebildete Chinon mit Ascorbinsäure wieder zum Rutin bzw. Myricitrin. Die Reduzierbarkeit war am Wiederanstieg der Extinktion im langwelligen Maximum zu erkennen. Messungen im kurzwelligen Maximum sind nicht möglich, da hier auch die Ascorbinsäure und die Dehydroascorbinsäure absorbieren.

Analog zu diesen Versuchen wurde Myricitrin mit Ce(IV)-sulfat-Lösung in 2 proz. Schwefelsäure oxidiert. Das stark saure Milieu wurde gewählt, weil Chinone im Sauren wesentlich beständiger sind. Im Abstand von 20 sec. wurden dem Reaktionsansatz Proben entnommen und mit gleichen Mengen Ascorbinsäurelösung vermischt, wobei sich die Ascorbinsäure im Überschuß befand, so daß alle reduzierbaren Anteile reduziert wurden. Anschließend wurde die Extinktion der Proben im Spektralphotometer bei 350 nm bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden verdoppelt und mit den zu entsprechenden Zeitpunkten gemessenen Extinktionen einer nichtreduzierten Lösung verglichen.

Es zeigte sich, daß in den ersten 40 sec. ein leichter Anstieg der Extinktion gegenüber der nichtreduzierten Lösung zu messen war ($E = 0,015$). Zu den dann folgenden Zeitpunkten war die Extinktion der reduzierten Lösung ebenso groß wie die der nichtreduzierten.

Zusammenfassung und Ergebnis

Läßt man auf Myricetin in aetherischer Lösung Silberoxid einwirken, so entsteht eine rote Lösung; die Farbe ist auf die Bildung eines o-Chinons zurückzuführen. Diese Reaktion blieb beim Myricitrin aus. Mit anderen Oxidationsmitteln tritt auch hier eine Reaktion ein. Da sich das zwischenzeitlich gebildete Produkt reduzieren läßt, ist anzunehmen, daß es sich hier um das Myricitrinchinon handelt. Es ließen sich jedoch sowohl vom Myricetinchinon als auch vom Myricitrinchinon keine stabilen Derivate darstellen. Diese Ergebnisse regten uns zu den potentiometrischen Messungen an, die im elektrochemischen Teil beschrieben werden. Sie sollten uns Aufschluß über die Beständigkeit der Chinone und ihre Redoxpotentiale geben.

C. Elektrochemischer Teil

1. Einleitung

Wie die Untersuchungen am Myricetin und Myricitrin zeigen, bildet sich bei der enzymatischen und nichtenzymatischen Oxidation dieser Stoffe intermediär ein 3'-Hydroxy-o-chinon. Da sich präparativ ein stabiles Derivat des gebildeten Chinons mit den angewandten Methoden nicht darstellen ließ, wurde die Reaktion auf elektrochemischem Wege näher charakterisiert.

Hierzu benutzt man allgemein die Messung der Redoxpotentiale. Potentiale von stabilen und reversiblen Redox-Systemen lassen sich verhältnismäßig leicht durch Titration bestimmen. Nun sind aber die hier zu untersuchenden 3-Hydroxy-o-chinone in wäßriger Lösung relativ unbeständig - sie dimerisieren bzw. polymerisieren -, und so muß auf Methoden zurückgegriffen werden, die die Bestimmung von instabilen Redoxsystemen mit einiger Genauigkeit möglich machen.

In der Literatur gibt es dafür mehrere Beispiele.

a. Polarographie

Horner und Geyer (27) bestimmten die Redoxpotentiale einiger Brenzcatechin-Derivate auf polarographischem Wege. Diese Methode konnte aber nicht angewendet werden, weil - unter Verwendung der Quecksilbertropfelektrode - die zu erwartenden Potentiale teilweise in die Oxidationsstufe des Quecksilbers fallen.

b. Eine andere Methode ist unter dem Namen "diskontinuierliche Titration" in die Literatur eingegangen. Dieses Verfahren wird in zwei verschiedenen Versionen praktiziert.

Fieser und andere (28, 29) bestimmten die Redoxpotentiale einiger Verbindungen, indem sie zu einer abgemessenen Menge Reduktionsmittel jeweils verschiedene Mengen an Oxidationsmittel hinzusetzten. Es wurde für die verschiedenen Redoxverhältnisse der Abfall der Potentiale mit der Zeit gemessen

und auf die Zeit 0 extrapoliert. Somit wurden mehrere Punkte der Titrationskurve erhalten, aus der dann das Mittelpunktspotential E_m berechnet wurde. Ball, Chen und Clark (30) bestimmten die Redoxpotentiale instabiler Redoxsysteme, indem sie verschiedene Mischungen von Reduktions- und Oxidationsmittel an mehreren Elektroden vorbeifließen ließen. Die Potentialabnahme an den einzelnen Elektroden wurde gemessen. Da diese Methode für unsere Untersuchungen verwendet wurde, soll später darauf noch näher eingegangen werden.

Voraussetzung für die Bestimmung von Redoxpotentialen durch die "diskontinuierliche Titration" ist, daß sich das gebildete Oxidationsprodukt nach einer Reaktion 1. Ordnung aus dem Gleichgewicht entfernt; denn nur dann findet man einen linearen Abfall der Potentiale mit der Zeit. Außerdem muß die Oxidation quantitativ und genügend schnell erfolgen; pH, Ionenstärke und Temperatur müssen während der Messung konstant sein. Ebenso müssen die Elektroden genügend schnell auf die Potentialänderungen ansprechen.

2. Messung der Redoxpotentiale nach der Methode von Ball, Chen und Clark

a. Beschreibung des Meßvorganges und der Apparatur (Abb. 14)

Aus zwei kalibrierten Gefäßen (A und B) strömen durch je ein Kapillarrohr mit unterschiedlich schneller, aber gleichbleibender Geschwindigkeit jeweils 25 ml des Oxidations- und des Reduktionsmittels. Sie werden in der Mischkammer (M) gemischt. Diese Mischung läuft dann zur Messung an fünf Platin-Elektroden vorbei. Gemessen wird gegen eine Kalomel-elektrode; den Stromschlüssel bildet eine ebenfalls fließende gesättigte Kaliumchlorid-Lösung.

Als Anzeigegerät für die Potentiale wurde ein "Präzisions-pH-Meter" der Fa. Knick, Berlin, verwendet. Durch Regulierung der beiden Hähne P_1 und P_2 wurden unterschiedliche Durchlaufgeschwindigkeiten für das Oxidations- und Reduktionsmittel hergestellt.

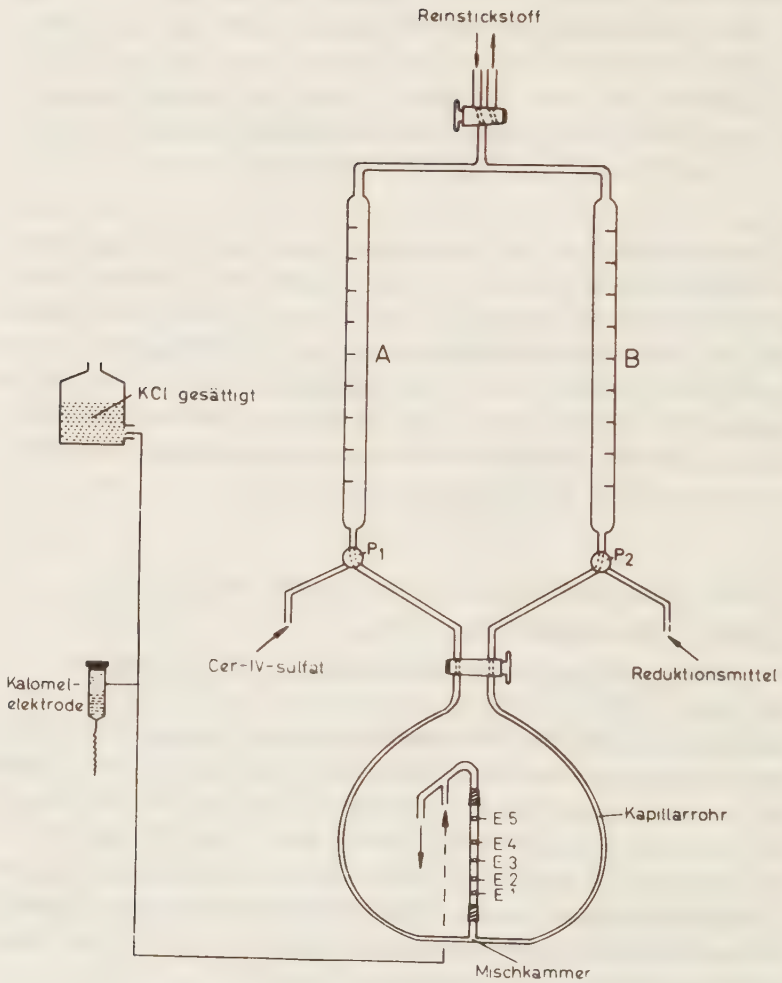


Abb. 14: Schema der Meßanordnung

Damit erhält man die für die Bestimmung notwendigen unterschiedlichen Redoxverhältnisse.

b. Reinigung der Elektroden

Da die Elektroden durch die Reaktionsprodukte schon nach kurzer Zeit vergiftet werden, mußten sie nach jeweils 3 - 4 Messungen gereinigt werden. Eine gründliche Reinigung wurde dadurch erzielt, daß man die Elektroden 30 min. lang in heiße konz. Salpetersäure stellte. Anschließend wurden die Elektroden 30 min. in gesättigter Natriumsulfit-Lösung aufbewahrt. Nach gründlichem Spülen mit Wasser waren die Elektroden wieder gebrauchsfähig.

c. Herstellung der Meßlösungen

Oxidationsmittel

Als Oxidationsmittel diente eine 0,002 M Ce(IV)-sulfat-Lösung in 5 proz. Schwefelsäure. Hierzu wurden 42,0 g Ce(IV)-sulfat p.a. in 200 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 50 g konz. Schwefelsäure p.a. versetzt und in einem Meßkolben auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung war ca. 0,1 M.

20 ml dieser Lösung wurden bei Bedarf mit 5 proz. Schwefelsäure auf 1000 ml verdünnt. Die Einstellung der Lösung erfolgte mit einer genau gewogenen Menge von $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a. (31). Durch Verdünnen wurde die Lösung jeweils auf den Faktor 1,000 eingestellt. Außerdem wurde untersucht, ob sich der Faktor ändert, wenn das Eisen(II)-Salz in 5 proz. Schwefelsäure oder in einer Mischung von Dioxan, LiCl und 5 proz. Schwefelsäure gelöst wird. Es trat dabei keine Änderung des Faktors auf, so daß man annehmen kann, daß bei der Messung der Redoxpotentiale in dieser Lösungsmittel-mischung kein Ce(IV)-sulfat vom Lösungsmittel verbraucht wird.

Reduktionsmittel

Die zu untersuchenden Flavone können wegen ihrer schlechten Löslichkeit nicht in rein wäßrigen Lösungsmitteln gemessen werden. Alle Substanzen wurden daher in einer Mischung von

drei Teilen Dioxan und sieben Teilen 5 proz. Schwefelsäure gemessen. Zur Erhöhung der Ionenstärke wurden 0,2 Mol Lithiumchlorid p.a. pro Liter Lösung zugesetzt. Die fertigen Lösungen enthielten also in 1000 ml:

0,002 Mol der zu oxidierenden Substanz

0,2 Mol LiCl

300 ml Dioxan

700 ml 5 proz. H_2SO_4 .

c. Bestimmung des pH-Wertes in der Mischkammer

Zur Berechnung der "Normalpotentiale", die man auf den pH 0 bezieht, ist die Bestimmung des pH-Wertes notwendig. Definitionsgemäß gilt der pH-Wert nur für wässrige Lösungen; man kann deshalb bei organischen Lösungsmitteln enthaltenden Lösungen nur von einem scheinbaren pH-Wert sprechen. Der in der Mischkammer resultierende pH-Wert wurde für das Redoxverhältnis $R = \frac{\text{Ox}}{\text{Red}} = 1$ ermittelt.

Das Reaktionsgemisch enthielt 15 % Dioxan und 85 % 5 proz. Schwefelsäure. Es wurde bei sehr niedrigem pH-Wert gemessen, da hier die Chinone die größte Stabilität aufweisen sollen (27).

3. Auswertung der Messungen

a. Nernst-Peters-Gleichung

Ausgangspunkt für die Berechnung der Elektrodenpotentiale für das Hydrochinon/Chinon-System ist die Nernst-Peters-Gleichung:

$$(t = 20^\circ) \quad E = E_0 + \frac{0,058}{2} \cdot \log \frac{[\text{Ox}] \cdot [\text{H}]^2}{[\text{Red}]} \quad [\text{V}] \quad \text{Gl. 1}$$

Wenn H^+ konstant ist, kann man den Ausdruck $0,029 \cdot \log \text{H}^{+2}$ und E_0 zu E_m zusammenfassen. E_m wird als Mittelpunktspotential bezeichnet und gibt das Potential eines Redox-Systems bei einem bestimmten pH-Wert und bei gleicher Aktivität der oxidierten und reduzierten Stufe an.

$$(t = 20^{\circ}) \quad E = E_m + 0,029 \cdot \log \left[\frac{[Ox]}{[Red]} \right] \quad [V] \quad \text{Gl. 2}$$

Durch Umformung der Gleichung ergibt sich dann für E_m

$$E_m = E - 0,029 \cdot \log \left[\frac{[Ox]}{[Red]} \right] \quad [V] \quad \text{Gl. 3}$$

E_m entspricht den polarographischen Halbstufenpotentialen (32), die von Horner und Geyer (27) gemessen wurden.

b. Berechnung von $R = \frac{Ox}{Red}$

Das Redoxverhältnis R berechnet sich aus der pro Zeiteinheit durchgeflossenen Menge an Reduktionsmittel und Oxidationsmittel

$$V_{Redm} = \frac{\text{ml zu oxidierende Lösung (0,002 M)}}{\text{Durchlaufzeit}} \quad [ml/sec]$$

$$V_{Oxm} = \frac{\text{ml 0,002 M Ce(IV)-sulfat-Lösung}}{\text{Durchlaufzeit}} \quad [ml/sec]$$

Da bei der Oxidation von einem Mol Hydrochinon zu einem Mol Chinon zwei Mole Ce(IV)-sulfat benötigt werden, entspricht - vorausgesetzt, daß die Umsetzung quantitativ erfolgt - die Menge des gebildeten Chinons dem halben Zusatz an Oxidationsmittel.

Demzufolge ist:

$$\frac{Ox}{Red} = R = \frac{1/2 V_{Oxm}}{V_{Redm} - 1/2 V_{Oxm}} \quad \text{oder} \quad R = \frac{V_{Oxm}}{2 V_{Redm} - V_{Oxm}}$$

c. Ermittlung des Initialpotentials E_i

Für reversible Redoxpotentiale gilt Gl. 2. Bei instabilen Chinonderivaten, die Sekundärreaktionen eingehen, nimmt das an den verschiedenen Elektroden gemessene Potential in der Fließrichtung ab.

Es gilt:

$$-\frac{dE}{dt} = K_1 \cdot \frac{d[Ox]}{[Ox]dt} \quad (t = 20^\circ) \quad \text{Gl. 4}$$

Setzt sich das gebildete Chinon nach einer Reaktion 1. Ordnung um, so ist:

$$-\frac{d[Ox]}{dt} = K_2 \cdot [Ox]$$

oder

$$K_2 = -\frac{d[Ox]}{dt [Ox]} \quad \text{Gl. 5}$$

Setzt man Gleichung 5 in Gleichung 4 ein, so ergibt sich:

$$-\frac{dE}{dt} = K_1 \cdot K_2$$

oder

$$-\frac{dE}{dt} = \text{const.}$$

Wie die Meßergebnisse zeigen, folgen einige Verbindungen der Gleichung annähernd für einen bestimmten Zeitraum, andere dagegen wiesen nur an den ersten Elektroden einen konstanten Abfall auf, so daß dann nur diese Werte zur Berechnung von E_m herangezogen wurden.

Das Potential, das sich im Augenblick der Mischung, also zur Zeit 0 einstellt (E_1), wird graphisch ermittelt, indem man die an den einzelnen Elektroden gemessenen Potentiale gegen die Durchlaufzeiten durch die Elektrodenräume aufträgt. Durch Verlängerung der linear verlaufenden Potential-Zeit-Kurven wird auf die Zeit 0 extrapoliert.

Die Durchlaufzeiten t_D ergeben sich aus dem Verhältnis des Volumens der Elektrodenräume zu den Strömungsgeschwindigkeiten von Reduktions- und Oxidationsmittel.

$$t_D = \frac{\text{Volumen der Elektrodenräume}}{V_{\text{Redm}} + V_{\text{Oxm}}} \quad [\text{sec}]$$

Das Volumen betrug: von der Mischkammer

- bis zur 1. Elektrode = 0,6 ml
- bis zur 2. Elektrode = 0,83 ml
- bis zur 3. Elektrode = 1,11 ml
- bis zur 4. Elektrode = 1,36 ml
- bis zur 5. Elektrode = 1,77 ml.

Diese Werte wurden ermittelt, indem das für die Füllung der Elektrodenräume erforderliche Volumen an Wasser gemessen wurde.

d. Berechnung des Mittelpunktpotentials E_m

Setzt man in der Gleichung 3 für E das graphisch ermittelte Potential zur Zeit 0 [E_1] ein, so ergibt sich für die verschiedenen, auf $R = 1$ umgerechneten Redoxverhältnisse das Mittelpunktpotential E_m

$$E_m = E_1 - 0,029 \log \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} \quad [\text{V}] \quad \text{Gl. 7}$$

e. Graphische Ermittlung von E_m

Trägt man die unterschiedlichen E_1 -Werte gegen die verschiedenen Redoxverhältnisse auf ($E_1 = f(R)$), so erhält man die Titrationskurve für das Redox-System. Der Wendepunkt der Kurve liegt bei $R = 1$, er entspricht dem Mittelpunktpotential E_m .

f. Umrechnung auf das Normalpotential E_0

In der Literatur werden häufig Normalpotentiale für Redox-Systeme angegeben. Definitionsgemäß sind dies Potentiale, die auf $R = 1$, $\text{pH} = 0$ und auf die Normalwasserstoffelektrode bezogen werden. Sie gelten folglich nur für rein wässrige Lösungen. Die bei unseren Messungen gefundenen E_0 -Werte sind deshalb nur Näherungswerte. Zu ihrer Berechnung ist zu den ermittelten Mittelpunktpotentialen noch das Potential einer Kalomelelektrode bei 20°C zu addieren. Ebenso zu addieren ist der Wert, der sich aus der Umrechnung vom gemessenen, scheinbaren pH auf pH 0 ergibt.

$$E_o \text{ (Kalomelelektrode, } t = 20^\circ) = 0,2476 \text{ V (33)}$$

Folglich ist dann:

$$E_o = E_m + 247,6 + 58 \cdot \text{pH [m V]} \quad (t = 20^\circ) \quad \text{Gl. 8}$$

4. Bemerkungen

Um abschätzen zu können, wie groß der Unterschied zwischen den Potentialen von in organischen Lösungsmitteln gemessenen Substanzen zu denen in wäßrigen Lösungsmitteln bestimmten ist, wurde Pyrogallol, da es Bezugssubstanz für unsere Betrachtungen ist, einmal in 5 proz. H_2SO_4 und zum anderen in der für die Flavone verwendeten Lösungsmittelmischung bestimmt.

Außerdem erschien es interessant, die Potentiale von Myricitrin und Myricetin mit denen von Rutin und Quercetin zu vergleichen. Aus diesem Grund wurden letztere hier unter den gleichen Bedingungen mitbestimmt. Als weiteres sollte untersucht werden, welchen Einfluß ein Chromonyl-Rest gegenüber einem Carboxyl- bzw. Carbonsäureester-Rest auf das Potential vom Pyrogallol ausübt.

Folgende Verbindungen wurden bestimmt:

<u>a</u>	Pyrogallol in 5 proz. Schwefelsäure				
<u>b</u>	Pyrogallol in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure	3:7	(v/v)		
<u>c</u>	Myricitrin in Dioxan-5 proz.	"	3:7	(v/v)	
<u>d</u>	Myricetin " " "	"	1:1	(v/v)	
<u>e</u>	Rutin " " "	"	3:7	(v/v)	
<u>f</u>	Quercetin " " "	"	3:7	(v/v)	
<u>g</u>	Gallussäure" " "	"	3:7	(v/v)	
<u>h</u>	Gallussäure- äthylester " " "	"	3:7	(v/v)	
<u>i</u>	Dimeres Myricetin " " "	"	3:7	(v/v)	

5. Meßergebnisse

a. Pyrogallol in 5 proz. Schwefelsäure

Die Auswertung wurde auf dieselbe Weise durchgeführt, wie unter C. 3. angegeben ist. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die Potential/Zeit-Kurven (Abb. 15) weisen einen starken Abfall auf.

- $\frac{dE}{dt}$ beträgt im Durchschnitt $23 \text{ mV} \cdot \text{sec}^{-1}$. Der Mittelwert aus den Mittelpunktspotentialen beträgt $451,3 \text{ mV}$ ($\text{pH} = 0,32$ für $R = 1$); das daraus berechnete Normalpotential 718 mV bei einer Temperatur von 20° .

In der Literatur wird für Pyrogallol - nach dieser Methode gemessen - ein Redoxpotential von 713 mV bei einer Temperatur von 30° angegeben (30). Berücksichtigt man, daß allgemein bei tieferen Temperaturen ein höherer Wert für E_0 gefunden wird (34), so stimmt der gefundene Wert gut mit dem in der Literatur angegebenen überein.

Im folgenden wurden die praktisch ermittelten Meßwerte punktförmig in die Abbildungen eingezeichnet, während die ausgezeichnete Linie den theoretisch berechneten Kurvenverlauf darstellt.

Die Meßpunkte für die Titrationskurve ($E_1 = f(R)$) unterscheiden sich von den theoretisch berechneten ($\bar{E}_m + 29 \cdot \log R = f(R)$).

Die theoretische Kurve verläuft für $R < 1$ unterhalb, also negativer und für $R > 1$ oberhalb, also positiver als die gemessene (Abb. 16).

Tab. 4: a 0,002 M Pyrogallol-Lösung in 5 %iger Schwefelsäure
mit Zusatz von 0,2 Mol/l LiCl
pH = 0,32 (für R = 1) t = 20° C

Durch- lauf- menge (ml)	Zeit(sec)		V _{Oxm} (ml/sec)	V _{Redm} (ml/sec)	E der Elektroden (mV)				
	Ce(IV)- Lösung	Redl.			1	2	3	4	5
25	37,2	41,2	0,670	0,607	456	438	432	429	424
25	40,4	45,4	0,620	0,550	454	435	429	426	420
25	67,4	33,6	0,372	0,745	443	429	424	422	417
25	47,6	32,2	0,525	0,780	449	432	429	425	419
25	49,0	61,0	0,510	0,410	451	439	425	424	418
25	37,6	40,8	0,665	0,610	454	438	429	425	419
25	43,3	48,3	0,577	0,517	452	435	425	422	417
25	41,5	39,0	0,603	0,640	450	433	426	422	417
25	53,0	39,8	0,472	0,627	445	429	422	419	415

t _D Durchlaufzeiten					E ₁ (mV)	R	29· logR	E _m (mV)	dE dt (mV/sec)
a	b	c	d	e					
0,47	0,63	0,8	1,0	1,29	452,7	1,24	+2,7	450	-22
0,51	0,69	0,86	1,1	1,4	451	1,28	+3,1	448	-23
0,54	0,72	0,91	1,1	1,45	441	0,33	-13,9	454	-17
0,46	0,61	0,78	0,97	1,26	447	0,51	-8,5	456	-22
0,65	0,87	1,1	1,38	1,8	456,5	1,65	+6,3	450	-21
0,47	0,63	0,8	1,0	1,29	455	1,18	+2,2	453	-28
0,55	0,73	0,93	1,16	1,51	452,5	1,26	+2,9	450	-24
0,49	0,65	0,82	1,02	1,34	449,5	0,886	-1,5	451	-26
0,55	0,73	0,93	1,16	1,51	443,5	0,601	-6,4	450	-20

$$\begin{aligned}\bar{E}_m &= 451,5 \text{ mV} \quad \pm 5 \text{ mV} \\ E_O &= 451,5 + 247,6 + 18,6 \\ E_O &= 717 \text{ mV} \quad (t = 20^\circ \text{ C})\end{aligned}$$

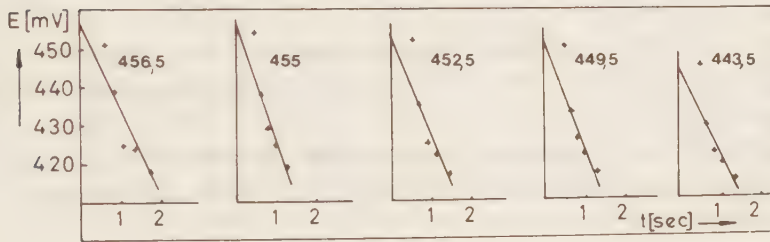
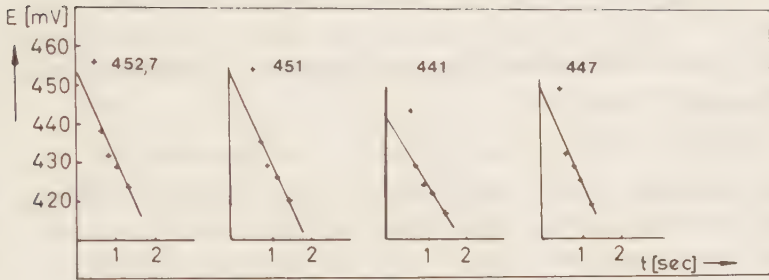


Abb. 15: Potential/Zeit-Kurven von Pyrogallol, gemessen in 5 proz. Schwefelsäure

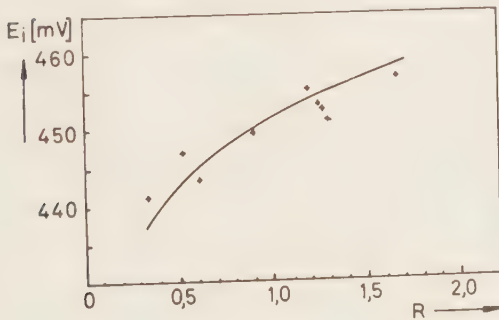


Abb. 16: Titrationskurve von Pyrogallol, gemessen in 5 proz. Schwefelsäure

b. Pyrogallol in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure

Eine Zusammenstellung der Meßergebnisse findet sich in Tabelle 5. Die Potential/Zeit-Kurven (Abb. 7) weisen gegenüber denen in rein wäßrigem Lösungsmittel gemessenen einen geringeren Abfall auf.

- $\frac{dE}{dt}$ beträgt hier im Durchschnitt 16 mV pro sec.

Der geringere Abfall läßt sich mit der größeren Beständigkeit der Chinone in organischen Lösungsmitteln erklären. Die Titrationskurven haben etwa den gleichen Verlauf wie die des Pyrogallols (gemessen in 5 proz. H_2SO_4).

Der Mittelwert aus den Mittelpunktspotentialen beträgt 460,9 mV (pH = 0,35 für $R = 1$), das "Normalpotential" 729 mV bei 20° C.

Es wird hier ein um 11 mV positiveres "Normalpotential" gefunden. Mit dieser Abweichung war zu rechnen, da man einen scheinbaren pH-Wert mißt und auf pH 0 extrapoliert.

Mit ähnlichen Verschiebungen muß also zu rechnen sein, will man die ermittelten Mittelpunktspotentiale auf sog. "Normalpotentiale" umrechnen.

Wegen der besseren Vergleichsmöglichkeiten wollten wir nicht darauf verzichten.

Tab. 5: b 0,002 M Pyrogallol in Dioxan-5 proz. H_2SO_4 mit
Mol/l LiCl
pH = 0,35 (für R = 1) t = 20° C

Durch- lauf- menge (ml)	Zeit(sec)		V_{Oxm} (ml/sec)	V_{Redm} (ml/sec)	E der Elektroden (mV)				
	Ce(IV)- Lösung	Redl.			1	2	3	4	5
25	54,0	66,0	0,463	0,379	461	445	439	436	428
25	63,2	44,8	0,396	0,558	454	444	434	435	431
25	60,8	71,5	0,411	0,349	456	441	431	430	426
25	112,3	68,4	0,223	0,365	448	436	432	432	425
25	50,0	40,0	0,500	0,625	457	447	441	438	435
25	50,2	33,0	0,498	0,758	454	444	437	435	430
25	57,0	69,3	0,439	0,361	457	442	433	431	427
25	65,0	48,5	0,385	0,515	450	441	433	431	426
25	46,8	49,0	0,534	0,510	462	450	444	442	437

t_D Durchlaufzeiten (sec)					E_1 (mV)	R	$29 \cdot \log R$	E_m (mV)	$\frac{dE}{dt}$ (mV/sec)
a	b	c	d	e					
0,71	0,99	1,32	1,62	2,1	464,5	1,57	+5,7	459	-18
0,63	0,87	1,16	1,43	1,86	455,7	0,55	-7,6	463	-24
0,79	1,09	1,45	1,79	2,33	459,5	1,43	+4,5	455	-18
1,02	1,41	1,89	2,31	3,0	455	0,448	-10,4	465	-10
0,53	0,74	0,99	1,21	1,57	455	0,67	-5,1	460	-13
0,48	0,66	0,88	1,08	1,41	456	0,49	-8,9	465	-20
0,75	1,04	1,39	1,70	2,21	455	0,70	-4,6	460	-14
0,67	0,92	1,23	1,51	1,96	454,5	0,6	-6,5	461	-14
0,57	0,79	1,06	1,3	1,69	461	1,1	+1,2	460	-15

$$\begin{aligned} \bar{E}_m &= 460,9 \text{ mV} \quad \pm 5 \text{ mV} \\ E_o &= 460,9 + 247,6 + 20,3 \\ E_o &= 729 \text{ mV} \quad (t = 20^\circ \text{ C}) \end{aligned}$$

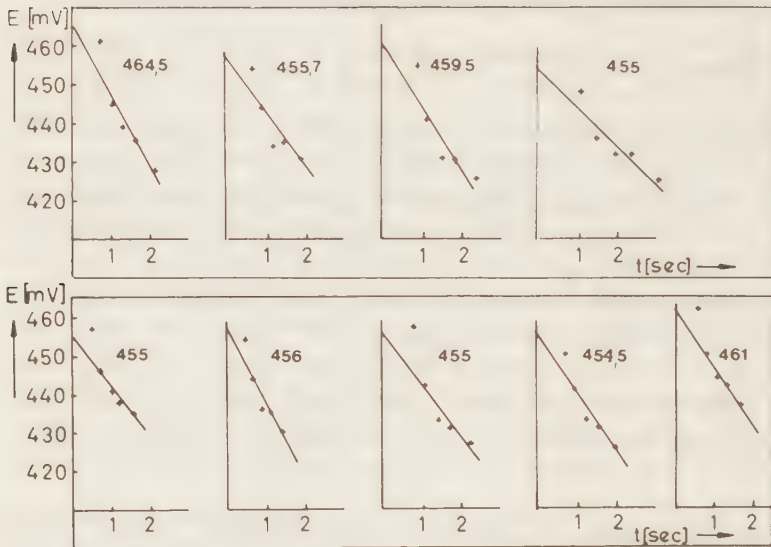


Abb. 17: Potential/Zeit-Kurven von Pyrogallol in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

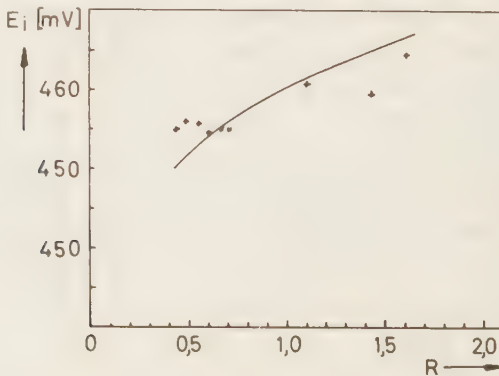


Abb. 18: Titrationskurve von Pyrogallol in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

c. Myricitrin in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure

Die Meßergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Die Potential/Zeit-Kurven weisen einen durchschnittlichen Abfall von $19 \text{ mV} \cdot \text{sec}^{-1}$ auf. Der durch die Meßpunkte angedeutete Verlauf der Titrationskurve ähnelt dem des Pyrogallols (Abb. 19).

Der Mittelwert aus den Mittelpunktpotentialen beträgt $547,3 \text{ mV}$ ($\text{pH} = 0,3$ für $R = 1$), das Normalpotential 812 mV ($t = 20^\circ \text{ C}$).

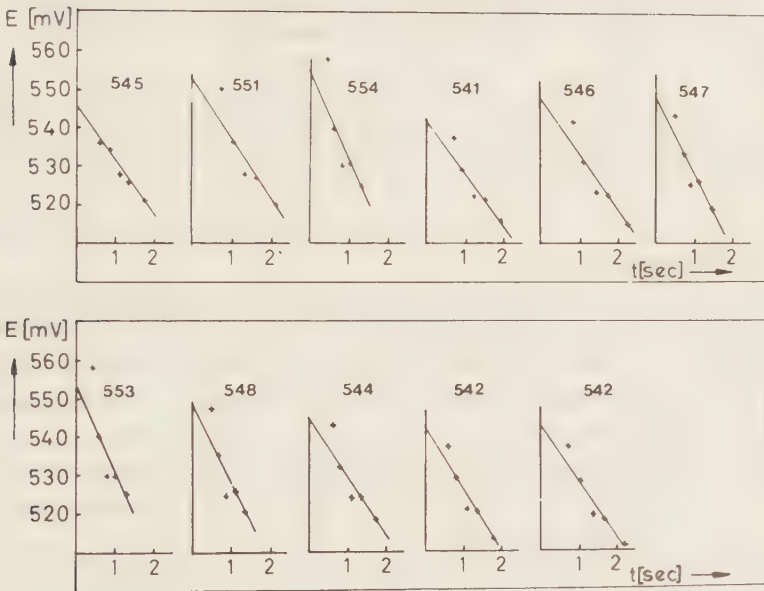


Abb. 19: Potential/Zeit-Kurven von Myricitrin in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

Tab. 6: c 0,002 M Myricitrin-Lösung in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure mit 0,2 Mol/l LiCl
pH = 0,30 t = 20° C

Durchlaufmenge (ml)	Zeit(sec)		V _{Oxm} (ml/sec)	V _{Redm} (ml/sec)	E der Elektroden (mV)				
	Ce(IV)-Lösung	Redl.			1	2	3	4	5
25	56,0	45,2	0,446	0,553	536	534	528	526	521
25	53,4	65,8	0,468	0,379	550	536	528	527	520
25	31,6	44,8	0,791	0,558	558	540	530	531	525
25	61,3	48,0	0,407	0,520	537	529	522	521	516
25	60,3	65,8	0,415	0,379	542	531	523	522	515
25	41,0	37,8	0,609	0,661	543	533	525	526	519
25	31,7	41,5	0,788	0,602	558	540	530	530	525
25	37,3	38,9	0,670	0,642	547	535	525	526	520
25	47,5	50,2	0,526	0,498	543	532	524	524	518
25	67,4	38,9	0,370	0,642	537	529	527	520	513
25	75,0	50,6	0,333	0,494	537	528	519	518	511

t _D Durchlaufzeiten (sec)					E ₁ (mV)	R	29. logR	E _m (mV)	dE (mV/ dt (sec))
a	b	c	d	e					
0,6	0,83	1,11	1,36	1,77	545	0,68	-4,9	550	-13
0,71	0,98	1,31	1,61	2,09	551	1,60	+5,9	545	-15
0,44	0,62	0,82	1,01	1,31	554	2,43	+11,2	543	-23
0,65	0,9	1,2	1,47	1,91	541	0,65	-5,6	547	-14
0,76	1,05	1,4	1,71	2,23	546	1,20	+2,3	544	-14
0,47	0,65	0,87	1,07	1,39	543	0,86	-2,0	549	-20
0,43	0,6	0,8	0,98	1,27	553	1,89	+8,0	545	-22
0,46	0,63	0,85	1,04	1,35	548	1,09	+1,1	547	-21
0,59	0,81	1,08	1,33	1,73	544	0,77	-3,3	547	-15
0,59	0,82	1,1	1,34	1,75	542	0,41	-11,4	553	-17
0,72	1,0	1,34	1,64	2,14	542	0,51	-8,5	551	-15

$$\bar{E}_m = 547,4 \text{ mV} \quad \pm 5 \text{ mV}$$

$$E_o = 547,4 + 247,6 + 17,4$$

$$E_o = 812 \text{ mV} \quad (t = 20^\circ \text{ C})$$

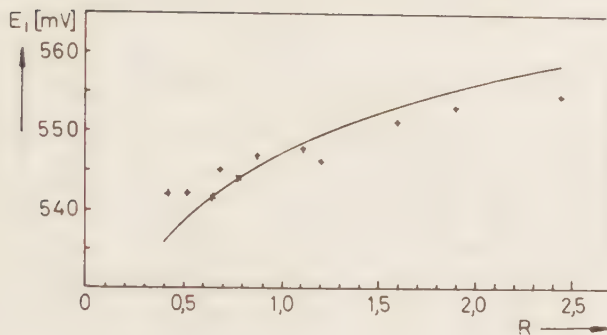


Abb. 20: Titrationskurve von Myricitrin in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

d. Myricetin in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure

Die Meßergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Der aus dem Potential/Zeit-Kurven ermittelte durchschnittliche Potentialabfall beträgt $10 \text{ mV} \cdot \text{sec}^{-1}$ (Abb. 21).

Da sich in dem sonst verwendeten Lösungsmittel aus 3 Teilen Dioxan und 7 Teilen 5 proz. Schwefelsäure das gebildete Chinon sofort während der Messung teilweise auf den Elektroden absetzte, wurde bei der Bestimmung von Myricetin der Stoff in einer Lösungsmittelmischung von 50 Prozent Dioxan und 50 Prozent 5 proz. Schwefelsäure gelöst. Der Potentialabfall war deshalb auch etwas geringer als erwartet.

Der Mittelwert aus den Mittelpunktpotentialen beträgt $492,5 \text{ mV}$ ($\text{pH} = 0,39$ für $R = 1$; für das "Normalpotential" wurden 763 mV bei einer Temperatur von 20°C gefunden).

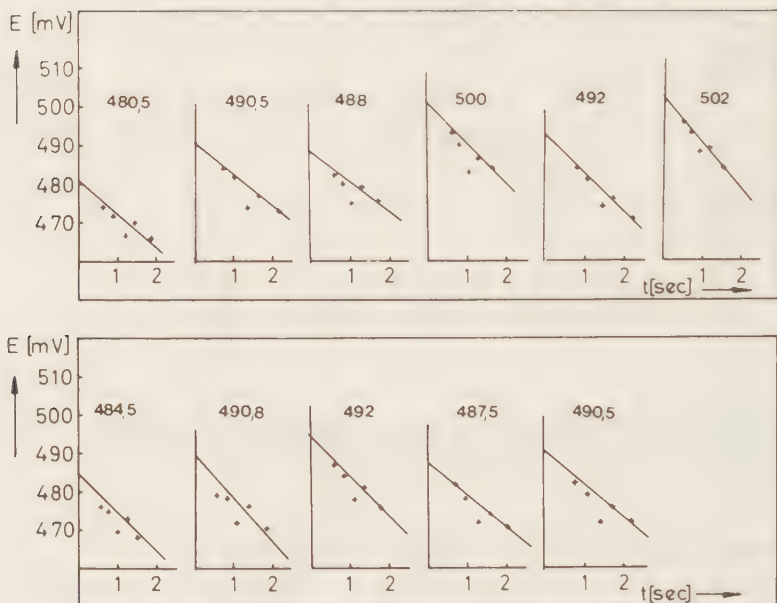


Abb. 21: Potential/Zeit-Kurven von Myricetin in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

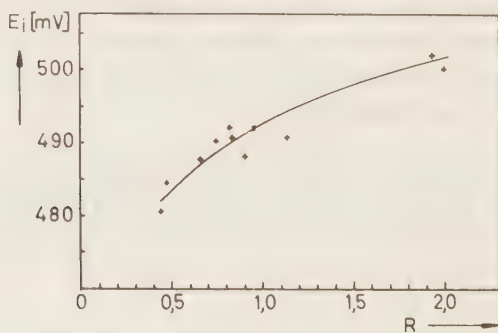


Abb. 22: Titrationskurve von Myricetin in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

Tab. 7: d 0,002 M Myricetin-Lösung in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure (1:1) mit 0,2 Mol/l LiCl
pH = 0,39 t = 20° C

Durchlaufmenge (ml)	Zeit(sec)		V _{Oxm} (ml/sec)	V _{Redm} (ml/sec)	E der Elektroden (mV)				
	Ce(IV)-Lösung	Redl.			1	2	3	4	5
25	70,0	42,3	0,357	0,591	474	472	467	470	466
25	58,0	61,8	0,431	0,405	484	482	474	477	473
25	47,3	44,8	0,528	0,558	482	481	475	479	476
25	40,0	53,4	0,625	0,468	493	490	483	487	484
25	63,0	61,8	0,397	0,404	484	481	474	476	471
25	37,5	49,5	0,667	0,505	496	493	488	489	484
25	58,4	37,5	0,428	0,667	476	475	470	473	468
25	55,2	46,8	0,452	0,534	479	478	472	476	470
25	53,0	47,8	0,472	0,523	487	484	478	481	476
25	64,6	51,5	0,387	0,485	482	478	472	474	471
25	65,0	59,0	0,376	0,420	482	479	472	476	472

t _D Durchlaufzeiten (sec)					E ₁ (mV)	R	29·logR	E _m (mV)	dE (mV/sec)
a	b	c	d	e					
0,63	0,87	1,17	1,43	1,87	480,5	0,432	-10,5	491	- 9
0,71	0,99	1,33	1,63	2,12	490,5	1,14	+1,7	488,8	- 9
0,55	0,76	1,02	1,25	1,63	488	0,90	-1,3	489,3	- 8
0,55	0,76	1,02	1,24	1,62	500	2,00	+8,7	491,3	-10
0,75	1,03	1,39	1,7	2,21	492	0,96	-0,5	492,5	-10
0,51	0,71	0,95	1,16	1,51	502	1,94	+8,3	493,7	-12
0,55	0,76	1,01	1,24	1,62	484,5	0,47	-9,4	493,9	-10
0,61	0,84	1,12	1,38	1,79	490	0,74	-3,9	493,9	-12
0,6	0,83	1,11	1,36	1,77	492	0,82	-2,4	494,4	-11
0,69	0,95	1,27	1,56	2,03	487,5	0,66	-5,2	492,7	- 9
0,75	1,03	1,38	1,69	2,20	490,5	0,83	-2,3	492,8	-10

$$\bar{E}_m = 492,0 \text{ mV} \quad \pm 3 \text{ mV}$$

$$E_o = 492,0 + 247,6 + 22,6$$

$$E_o = 762 \text{ mV} \quad (t = 20^\circ \text{ C})$$

e. Rutin in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure

Die Meßergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengestellt. Die Potential/Zeit-Kurven weisen beim Rutin den geringsten Abfall auf (Abb. 23) ($4 \text{ mV} \cdot \text{sec}^{-1}$).

Demzufolge liegen die Meßpunkte für die Titrationskurve nahe bei der theoretisch berechneten Kurve. Lediglich bei $R > 1$ lagen die gemessenen Werte etwas niedriger (Abb. 24).

Der Mittelwert aus den Mittelpunktspotentialen beträgt $610,9 \text{ mV}$ ($\text{pH} = 0,35$ für $R = 1$), das daraus berechnete "Normalpotential" 879 mV für 20°C .

Diedrich (9) fand für das Rutin in wäßrig-methanolischer Lösung bei 25°C und bei annähernd gleichem pH-Wert ($0,35$) für E_m 611 mV . Das Mittelpunktspotential wurde durch diskontinuierliche Titration nach der Methode von Fieser bestimmt (28).

Berücksichtigt man den Einfluß der Temperatur und des Lösungsmittels auf die Potentiale, so unterscheiden sich die Werte nur um 5 mV .

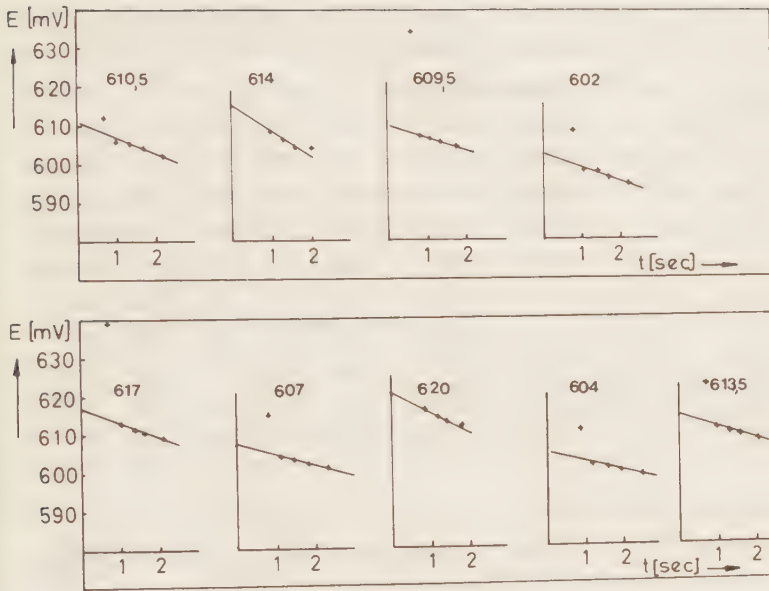


Abb. 23: Potential/Zeit-Kurven von Rutin in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

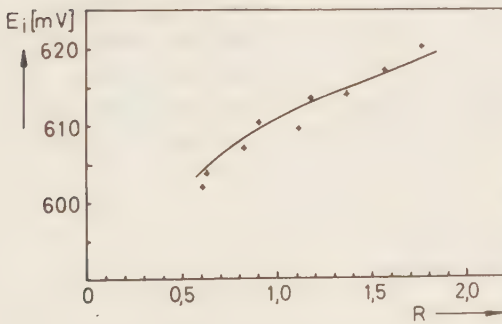


Abb. 24: Titrationskurve von Rutin in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

Tab. 8: e 0,002 M Rutin-Lösung in Dioxan-5 proz. H_2SO_4 mit
0,2 Mol/l LiCl
pH = 0,35 t = 20° C

Durch- lauf- menge (ml)	Zeit(sec)		V_{Oxm} (ml/sec)	V_{Redm} (ml/sec)	E der Elektroden (mV)				
	Ce(IV)- Lösung	Redl.			1	2	3	4	5
25	61,8	58,6	0,404	0,426	612	606	605	604	602
25	53,6	61,7	0,466	0,405	641	608	606	604,5	604
25	47,4	50,3	0,527	0,497	634	607	606	605,5	604
25	74,6	55,3	0,335	0,453	608	598	597,5	596	594,5
25	54,0	65,9	0,463	0,379	640	613	611,5	610,5	609
25	69,3	62,5	0,360	0,400	615	604	603	602	601
25	45,9	58,4	0,515	0,428	646	616	614	613	612
25	82,0	62,8	0,305	0,398	610	601	600	599	598
25	55,8	60,1	0,448	0,415	622	610	609	608	607

t_D Durchlaufzeiten (sec)					E_1 (mV)	R	$29 \cdot \log R$	E_m (mV)	$\frac{dE}{dt}$ (mV/sec)
a	b	c	d	e					
0,72	1,0	1,34	1,64	2,13	610,5	0,90	-1,3	611,8	-4
0,64	0,95	1,27	1,56	2,04	614	1,36	+3,8	611,2	-7
0,59	0,81	1,08	1,33	1,73	609,5	1,13	+1,5	611	-3
0,76	1,05	1,41	1,73	2,24	602	0,59	-6,7	608,7	-3
0,71	0,99	1,32	1,62	2,1	617	1,57	+5,6	611,4	-4
0,79	1,09	1,46	1,79	2,33	607	0,82	-2,5	609,5	-2,5
0,62	0,86	1,14	1,4	1,82	620	1,75	+7,05	612,9	-5
0,85	1,18	1,58	1,93	2,52	604	0,62	-6,0	610	-2,5
0,69	0,96	1,28	1,58	2,05	613,5	1,17	+1,9	611,6	-3

$$\bar{E}_m = 610,9 \text{ mV} \pm 2 \text{ mV}$$

$$E_o = 610,9 + 247,6 + 20,3$$

$$E_o = 879 \text{ mV} \quad (t = 20^\circ \text{ C})$$

f. Quercetin in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure

Die Meßergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Potential/Zeit-Kurven weisen einen starken Abfall von durchschnittlich $18 \text{ mV} \cdot \text{sec}^{-1}$ auf. An den letzten Elektroden ist bei R = 1 ein geringer Abfall zu messen (Abb. 25). Dieses Ergebnis deckt sich mit den rein visuellen Beobachtungen, daß die rote Färbung in den Elektrodenräumen der letzten Elektroden kaum noch wahrzunehmen ist, eine Beobachtung, die bei den anderen hier vermessenen Stoffen nicht gemacht werden konnte.

Für das Mittelpunktspotential wurden 487 mV gefunden ($\text{pH} = 0,35$ für $R = 1$). Das daraus berechnete "Normalpotential" beträgt 755 mV. Horner und Geyer (27) fanden polarographisch 744 mV, Diedrich (9) durch diskontinuierliche Titration 742 mV ($t = 25^{\circ} \text{C}$).

Beide Autoren verwendeten wäßrig-methanolische Lösungen. Schätzt man die Einflüsse von Temperatur und Lösungsmittel ab, so wurde ein um etwa 5 mV positiveres Potential gefunden.

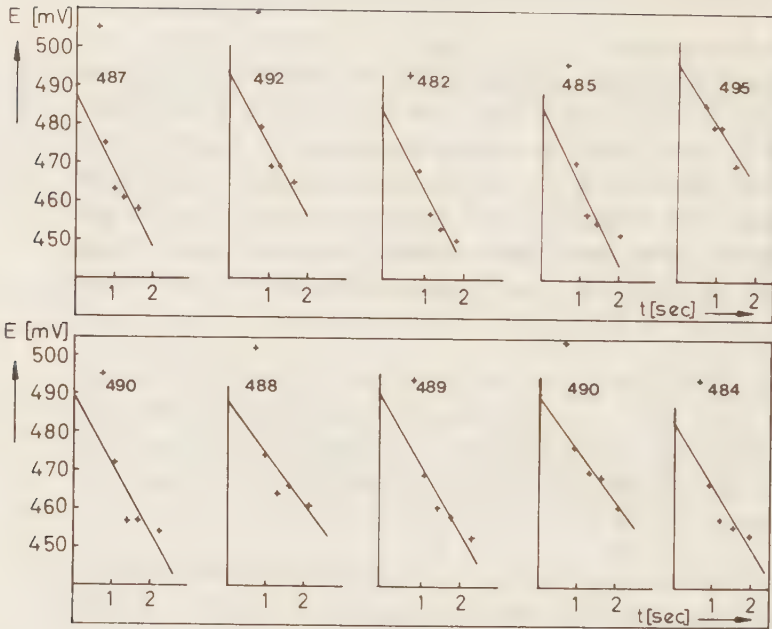


Abb. 25: Potential/Zeit-Kurven von Quercetin, in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

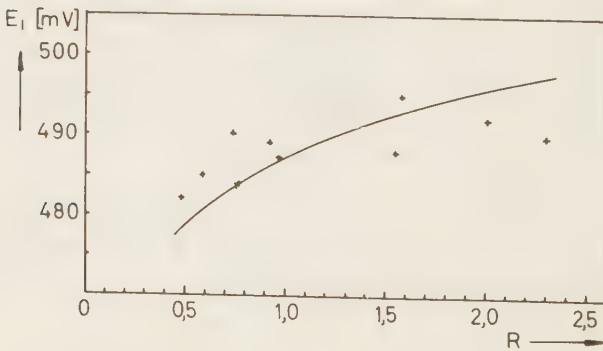


Abb. 26: Titrationskurve von Quercetin, in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

Tab. 9: f 0,002 M Quercetin-Lösung in Dioxan-5 proz. H_2CO_4
mit LiCl (0,2 Mol/l)
pH = 0,35 $t = 20^\circ C$

Durchlaufmenge (ml)	Zeit(sec)		V_{Oxm} (ml/sec)	V_{Redm} (ml/sec)	E der Elektroden (mV)				
	Ce(IV)-Lösung	Redl.			1	2	3	4	5
25	46,4	45,7	0,539	0,547	505	475	463	461	458
25	40,2	54,0	0,622	0,463	510	479	469	469	465
25	64,0	42,0	0,391	0,595	493	468	457	453	450
25	60,8	45,1	0,411	0,554	496	470	457	455	452
25	37,0	45,6	0,676	0,548	512	486	480	480	470
25	68,7	58,4	0,364	0,427	495	472	457	457	454
25	53,5	65,0	0,467	0,385	502	474	464	465	461
25	66,0	63,3	0,379	0,395	496	468	460	458	453
25	50,0	69,8	0,500	0,358	505	476	470	469	461
25	59,5	51,5	0,420	0,485	494	467	458	456	454

t_D Durchlaufzeiten (sec)					E_1 (mV)	R	$29 \cdot \log F$	E_m (mV)	$\frac{dE}{dt}$ (mV/sec)
a	b	c	d	e					
0,55	0,76	1,02	1,25	1,63	487	0,97	-0,4	487,4	-20
0,55	0,77	1,02	1,25	1,63	492	2,05	+9,0	483	-18
0,61	0,84	1,13	1,38	1,8	482	0,49	-9,0	491	-20
0,62	0,86	1,15	1,41	2,03	485	0,59	-6,6	491,6	-21
0,49	0,68	0,91	1,11	1,45	495	1,59	+5,9	489	-15
0,76	1,04	1,40	1,72	2,24	490	0,74	-3,8	486,2	-19
0,7	0,97	1,30	1,6	2,08	488	1,55	+5,5	484,5	-14
0,78	1,07	1,43	1,76	2,3	489	0,92	-1,0	490	-18
0,7	0,97	1,29	1,58	2,06	490	2,3	+10,5	479,5	-14
0,66	0,92	1,23	1,5	1,95	484	0,76	-3,4	487,4	-18

$$\bar{E}_m = 487 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$$

$$E_o = 487 + 247,6 + 20,3$$

$$E_o = 755 \text{ mV} \quad (t = 20^\circ C)$$

g. Gallussäure in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure

Eine Zusammenstellung der Meßergebnisse findet sich in Tabelle 10. Der durchschnittliche Abfall der Potential/Zeit-Kurven beträgt $21 \text{ mV} \cdot \text{sec}^{-1}$. Für das Mittelpunktspotential wurden 546,5 mV ermittelt ($\text{pH} = 0,35$ für $R = 1$). Das daraus errechnete "Normalpotential" beträgt 814 mV. Für wäßrige Lösungen wurden bei einer Meßtemperatur von 30°C 799 mV gefunden (30). Unter Berücksichtigung der anderen Bedingungen stimmen die Werte gut überein.

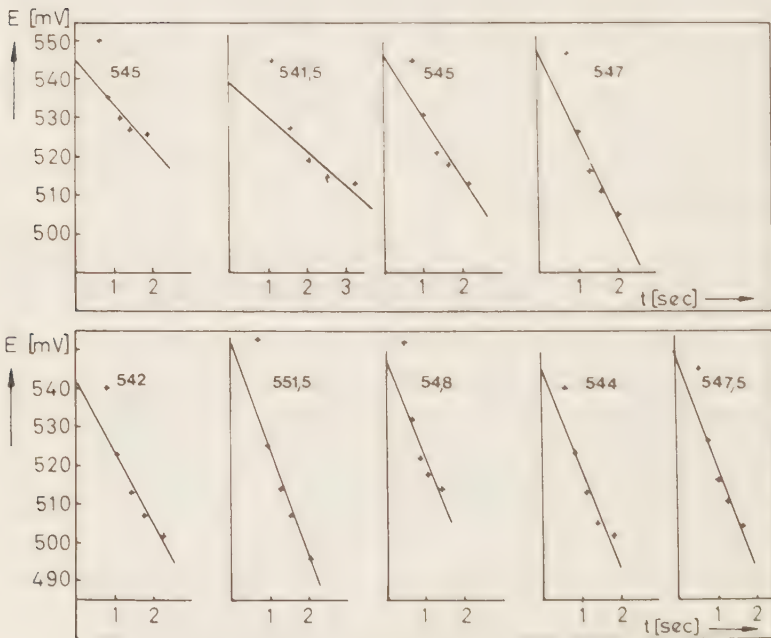


Abb. 27: Potential/Zeit-Kurven von Gallussäure, in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

Tab. 10: $\pm$ 0,002 M Gallussäure in Dioxan-5 proz. H_2SO_4 mit
0,2 Mol/l LiCl
pH = 0,35 $t = 20^\circ C$

Durchlauf- menge (ml)	Zeit(sec)		V_{Oxm} (ml/sec)	V_{Redm} (ml/sec)	E der Elektroden (mV)				
	Ce(IV)- Lösung	Redl.			1	2	3	4	5
25	57,5	48,5	0,434	0,515	550	535	530	527	526
25	108,0	80,1	0,231	0,312	545	527	519	515	513
25	67,1	51,1	0,328	0,489	545	531	521	518	513
25	53,4	61,2	0,468	0,408	547	526	516	511	505
25	76,3	55,0	0,327	0,454	540	523	513	507	502
25	48,6	71,0	0,514	0,352	553	525	514	507	496
25	38,7	44,2	0,645	0,565	552	532	522	518	514
25	58,0	47,0	0,431	0,531	540	523	513	505	502
25	49,0	47,5	0,555	0,526	545	526	516	510	504

t_D Durchlaufzeiten (sec)					E_1 (mV)	P	$29 \cdot \log P$	E_m (mV)	$\frac{dE}{dt}$ (mV/sec)
a	b	c	d	e					
0,63	0,87	1,17	1,43	1,87	545	0,73	-4,0	549	-11
1,10	1,53	2,04	2,51	3,26	541,5	0,59	-6,7	548,2	-20
0,73	1,02	1,36	1,66	2,17	545	0,62	-6,1	551,1	-15
0,68	0,95	1,27	1,55	2,02	547	1,34	+3,7	543,3	-22
0,77	1,06	1,42	1,74	2,27	542	0,56	-7,2	549,2	-19
0,69	0,96	1,28	1,57	2,04	551,5	2,71	+12,6	538,9	-27
0,50	0,69	0,92	1,12	1,46	548	1,33	+3,6	544,4	-26
0,62	0,86	1,15	1,41	1,84	544	0,68	-4,8	548,8	-25
0,56	0,77	1,03	1,26	1,69	547,5	1,12	+1,4	546,1	-28

$$\bar{E}_m = 546,5 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$$

$$E_G = 546,5 + 247,6 + 20,3$$

$$E_G = 814 \text{ mV} \quad (t = 20^\circ C)$$

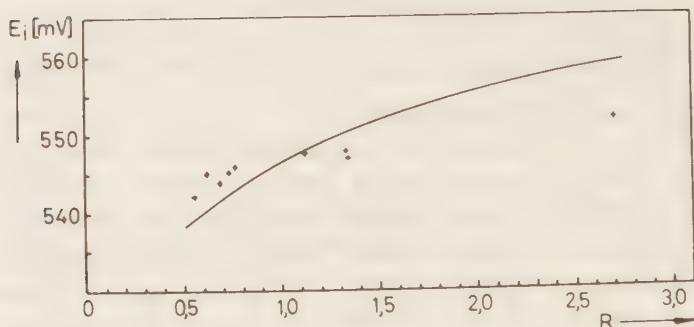


Abb. 28: Titrationskurve von Gallussäure, in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

h. Gallussäureäthylester in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure

Die Meßergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Die Potential/Zeit-Kurven verlaufen etwas flacher als bei der Gallussäure (Abb. 29). Der Abfall beträgt im Durchschnitt $13 \text{ mV} \cdot \text{sec}^{-1}$. Für E_m wurden $560,4 \text{ mV}$ gefunden ($\text{pH} = 0,35$ für $R = 1$); das daraus berechnete "Normalpotential" beträgt 828 mV .

Das Redox-Potential für diese Substanz ist in der Literatur bis jetzt noch nicht beschrieben.

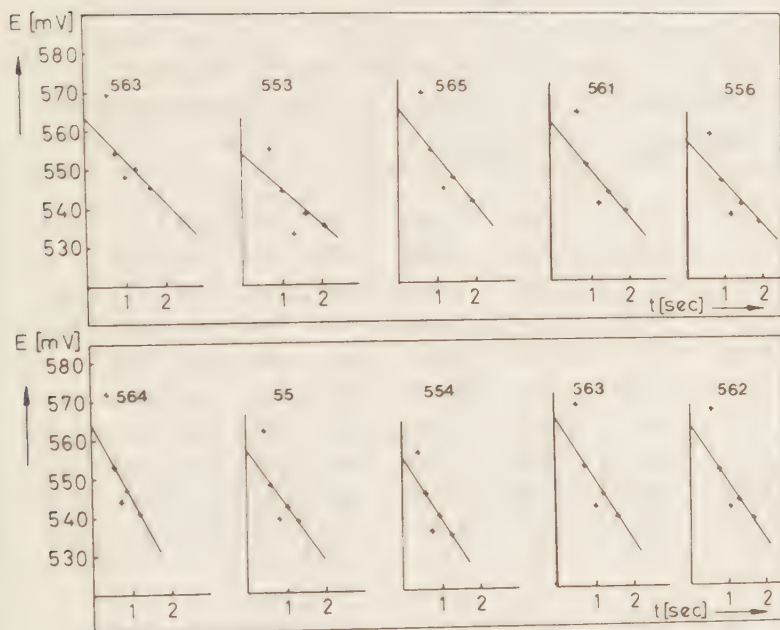


Abb. 29: Potential/Zeit-Kurven von Gallussäureäthylester, in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

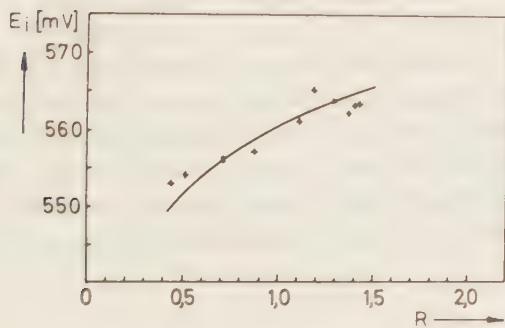


Abb. 30: Titrationskurve von Gallussäureäthylester, in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

Tab. 11: h 0,002 M Gallussäureäthylester in Dioxan-5 proz.
 H_2SO_4 mit 0,2 Mol/l LiCl
 pH = 0,35 t = 20° C

Durchlaufmenge (ml)	Zeit(sec)		V_{Oxm} (ml/sec)	V_{Redm} (ml/sec)	E der Elektroden (mV)				
	Ce(IV)-Lösung	Redl.			1	2	3	4	5
25	42,5	50,0	0,588	0,50	569	554	548	550	545
25	78,6	48,2	0,318	0,518	555	544	533	538	535
25	50,4	54,8	0,496	0,456	569	554	544	547	541
25	51,6	54,3	0,484	0,460	564	550	540	543	538
25	58,5	48,6	0,427	0,515	558	546	537	540	535
25	32,0	36,2	0,781	0,690	572	553	544	547	541
25	37,3	34,6	0,670	0,722	562	548	539	542	538
25	43,0	29,6	0,581	0,844	556	545	535	539	534
25	41,2	48,0	0,606	0,520	568	551	541	544	538
25	43,2	50,0	0,578	0,500	566	550	540	542	537

t_D Durchlaufzeiten (sec)					E_1 (mV)	R	$29 \cdot \log R$	E_m (mV)	$\frac{dE}{dt}$ (mV/sec)
a	b	c	d	e					
0,55	0,76	1,02	1,25	1,63	563	1,43	+4,3	558,7	-10
0,72	0,99	1,33	1,62	2,12	553	0,44	-10,3	563,3	- 9
0,63	0,87	1,17	1,42	1,86	565	1,19	+2,2	562,8	-12,5
0,64	0,88	1,18	1,44	1,88	561	1,11	+1,3	559,7	-12
0,64	0,88	1,18	1,44	1,88	556	0,71	+4,3	560,3	-11
0,41	0,56	0,75	0,92	1,20	564	1,30	+3,3	561,7	-18
0,43	0,60	0,80	0,98	1,27	557	0,87	-1,8	558,4	-14
0,42	0,58	0,78	0,95	1,24	554	0,52	-8,1	562,1	-14
0,53	0,73	0,99	1,21	1,57	563	1,40	+4,2	558,8	-10
0,56	0,77	1,03	1,26	1,64	562	1,37	+4,0	558	-16

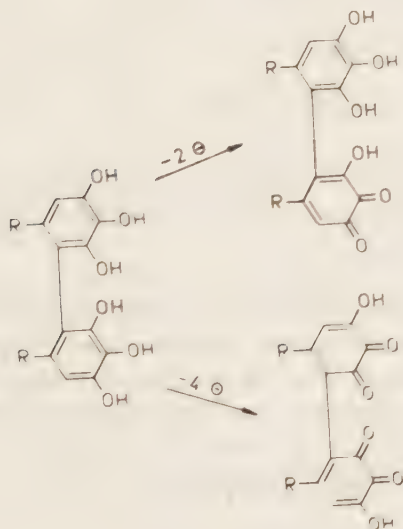
$$\bar{E}_m = 560,4 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$$

$$E_o = 560,4 + 247,6 + 20,3$$

$$E_o = 828 \text{ mV} \quad (t = 20^\circ \text{ C})$$

1. Dimeres Myricetin in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure

Die Auswertung der Meßergebnisse dieser Verbindung wirft einige Probleme auf, da das Molekül symmetrisch gebaut ist und jeweils zwei vicinale Trihydroxygruppen aufweist. Es können sich also Mono- und Bichinone ausbilden, wobei entweder zwei oder vier Elektronen übergehen.



Diese Chinone werden, wie alle Vertreter dieser Stoffgruppe, nicht sehr stabil sein und sich schnell weiter umsetzen. Da allerdings die Potential/Zeit-Kurven zum größten Teil einen "linearen" Abfall aufweisen, könnte man annehmen, daß sich das Oxidationsprodukt wenigstens während der kurzen Zeit der Messung nach einer Reaktion 1. Ordnung umsetzt.

In Anlehnung an die Arbeit von Hörner und Geyer (27), die 3,4,3',4' Tetrahydroxybiphenyl als dimere Verbindung polarographisch vermessen haben und bei etwa gleicher Meßdauer von 2 - 3 sec. nur eine, aber doppelt hohe Stufe fordern, wurde für die Auswertung der Messung ein Übergang von 4 Elektronen zugrunde gelegt.

Damit ergibt sich für das Redoxverhältnis:

$$R = \frac{V_{Oxm}}{4V_{Redm} - V_{Oxm}}$$

und für

$$E_m = E_1 - 0,0145 \cdot \log R$$

Die Meßergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Für die Potentialzeitkurven beträgt der Abfall durchschnittlich 10 mV pro sec. (Abb. 31).

Die Meßpunkte für die experimentell gefundene Titrationskurve zeigen, daß diese oberhalb von $R = 1$ wesentlich flacher verläuft. Ein Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der schwachen Reduktionskraft des Reduktionsmittels, so daß wir bei hohen Konzentrationen an Oxidationsmittel eine unvollständige Oxidation annehmen müssen.

Für E_m ergibt sich ein Mittelwert von 476,7 mV (pH = 0,33 für $R = 1$); das Normalpotential beträgt 743 mV.

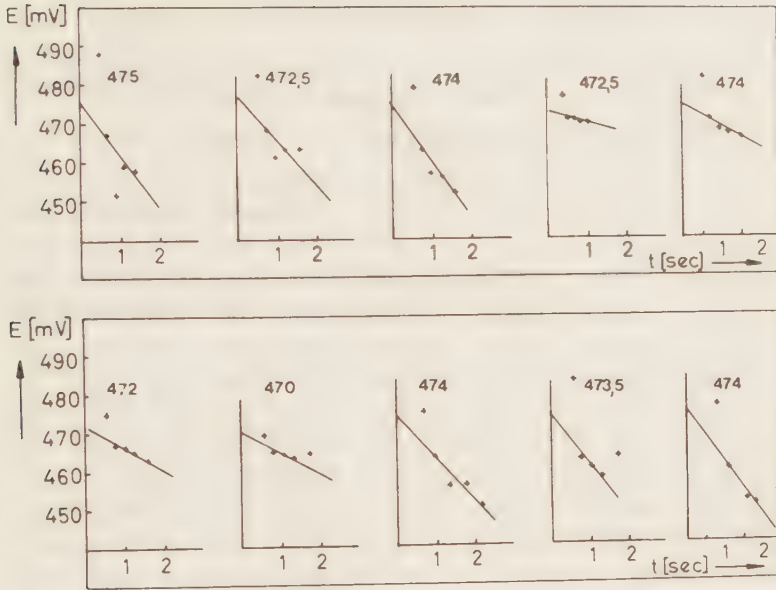


Abb. 31: Potential/Zeit-Kurven von dimerem Myricetin, in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

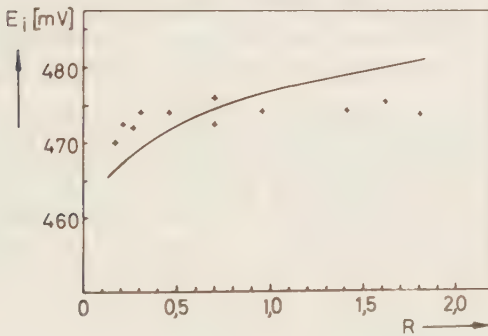


Abb. 32: Titrationskurve von dimerem Myricetin, in Dioxan-5 proz. Schwefelsäure gemessen

Tab. 12: 1 0,002 M Dimeres Myricetin in Dioxan/H₂SO₄ mit
0,2 Mol/l LiCl
pH = 0,33 t = 20° C

Durch- lauf- menge (ml)	Zeit(sec)		V _{Oxm} (ml/sec)	V _{Redm} (ml/sec)	E der Elektroden (mV)				
	Ce(IV)- Lösung	Redl.			1	2	3	4	5
25	28,3	70,0	0,883	0,357	488	467	452	459	458
25	35,1	58,3	0,712	0,430	482	468	461	463	463
25	33,0	64,8	0,758	0,386	479	463	457	456	452
25	34,0	24,8	0,735	1,008	477	471	471	470	470
25	44,0	41,9	0,586	0,597	482	471	468	467	466
25	49,4	42,4	0,506	0,590	475	467	466	465	463
25	67,0	39,8	0,373	0,628	469	465	464	463	464
25	54,7	68,6	0,457	0,364	475	463	456	456	450
25	40,5	52,4	0,616	0,477	483	462	450	457	463
25	62,5	73,3	0,400	0,342	476	459	451	450	453

t _D Durchlaufzeiten (sec)					E _f (mV)	R	29. logR	E _m (mV)	dE (mV/ dt (sec))
a	b	c	d	e					
0,49	0,67	0,89	1,1	1,43	475	1,62	+3,0	472	-16
0,53	0,73	0,97	1,2	1,55	472,5	0,71	-2,2	474,7	-12
0,53	0,73	0,97	1,2	1,55	474	0,96	-0,2	474,2	-14
0,39	0,48	0,64	0,78	1,02	472,5	0,22	-9,4	481,9	-3
0,52	0,71	0,95	1,16	1,52	474	0,31	-7,3	481,3	-6
0,55	0,76	1,01	1,24	1,61	472	0,27	-8,1	480,1	-6
0,6	0,83	1,11	1,36	1,77	470	0,17	-10,9	480,9	-6
0,73	1,02	1,36	1,66	2,17	474	0,46	-4,9	479,9	-11
0,56	0,77	1,03	1,26	1,64	473,5	1,83	+3,8	469,7	-13
0,81	1,12	1,5	1,83	2,4	474	1,41	+2,2	471,8	-15

$$\bar{E}_m = 476,7 \text{ mV} + 5 \text{ mV}$$

$$E_o = 476,7 + 247,6 + 19,2$$

$$E_o = 743 \text{ mV} \quad (t = 20^\circ \text{ C})$$

6. Zusammenstellung der Meßergebnisse

Die Ergebnisse aus den einzelnen Messungen sind in Tabelle 13 zusammengestellt. Sie sind in zwei Gruppen gegliedert:

- a. in Trihydroxyverbindungen mit Pyrogallol als Bezugssubstanz
- b. in Dihydroxyverbindungen mit Brenzcatechin als Bezugssubstanz.

Weiterhin ist in der Tabelle angegeben, welchen Einfluß die Substituenten auf die Stammverbindung haben.

Auffallend ist, daß ein in 3-Stellung nicht hydroxylierter Chromonylrest, wie er in Myricitrin vorliegt, das Redoxpotential des Pyrogallol um etwa den gleichen Betrag erhöht wie eine Carboxylgruppe (27). Eine Veresterung der Carboxylgruppe führt dann kaum noch zu einer Erhöhung (15 mV). Ein Chromonylrest mit freiem 3-Hydroxyl erhöht das Potential ebenso, wenn auch um einen geringeren Betrag (etwa 35 mV). Ein Flavonchinon-Rest in 5-Stellung und ein Chromonylrest in 4-Stellung bewirken beim Pyrogallol ebenfalls eine Erhöhung des Potentials, wenn diese auch gering ist (14 mV).

Vergleicht man dagegen den Einfluß eines in 3-Stellung hydroxylierten Chromonylrestes auf das Brenzcatechin, so wird hier das Potential von Brenzcatechin um etwa 60 mV erniedrigt, während ein in 3-Stellung glykosidierter Chromonylrest das Potential um etwa 65 mV erhöht.

Betrachtet man die Aglyka der Flavone, so liegen die "Normalpotentiale" alle bei ca. 750 mV, während die der Glykoside zwischen 810 und 880 mV liegen.

Tab. 13: Redoxpotentiale und Einfluß der Substituenten auf das Potential vom Pyrogallol

Verbindung	E_o (mV)	ΔE_{o1}^+	ΔE_{o2}^{++}	ΔE_{o3}^{+++}	$\frac{dE}{dt}$ (mV/sec)
Pyrogallol in H_2SO_4	717	-12mV	-	-	-23
Pyrogallol in Dioxan- H_2SO_4	729	-	-83mV	-34mV	-16
<u>Derivate des Pyro-</u> <u>gallols</u>					
Myricitrin	812	+83mV	-	+49mV	-19
Myricetin	763	+34mV	-49mV	-	-10
Dimeres Myricetin	743	+14mV	-69mV	-20mV	-10
Gallussäure	814	+85mV	+ 2mV	+51	-21
Gallussäureäthylester	828	+99mV	+16mV	+65	-13
<u>Brenzcatechin</u>	812	+83mV		-	-0,05
<u>Derivate des Brenz-</u> <u>catechins</u>					
Rutin	879	-	+67mV	-	- 4
Quercetin	755	-	-	+ 8	-18

- + ΔE_{o1} = Potential-Differenz von Pyrogallol zu den Derivaten des Pyrogallols und Brenzcatechins
 ++ ΔE_{o2} = Potential-Differenz von Myricitrin zu Pyrogallol und Derivaten des Pyrogallols und Brenzcatechins
 +++ ΔE_{o3} = Potential-Differenz von Myricetin zu Pyrogallol und Derivaten des Pyrogallols und Brenzcatechins

Die Abnahme der Potentiale pro Zeiteinheit kann als Maß für die Beständigkeit der Chinone herangezogen werden. Ein Vergleich der Stabilität von Chinonen der Dihydroxyverbindungen und der Trihydroxyverbindungen ergibt, daß Trihydroxyverbindungen instabilere Chinone bilden. Eine Ausnahme bildet das Quercetin, das mit einem Potentialabfall von ca. 18 mV pro sec. noch das Myricetin übertrifft.

Das Myricetinchinon weist gegenüber dem Myricitrinchinon eine größere Stabilität auf. Im Gegensatz dazu ist das Quercetinchinon wesentlich instabiler als das Rutinchinon.

Deine Deutung dieser Phänomene soll im Rahmen der Diskussion versucht werden.

D. Diskussion

Oxidiert man Myricitrin mit Peroxidase- H_2O_2 , so entsteht nach der Hydrolyse mit Schwefelsäure ein Produkt, das ein 2',2''-verknüpftes dimeres Myricetin darstellt.

1. Bildungsmechanismus

In diesem Abschnitt sollen unsere Versuchsergebnisse im Hinblick auf den Bildungsmechanismus von dimeren Flavonoiden erörtert werden. Nach den Erkenntnissen, die man über die oxidative Kupplung von Flavonoiden erhalten hat, lassen sich für die Dimerisierung sowohl ein radikalischer Mechanismus als auch ein Dehydrierungs-Additionsmechanismus angeben.

Der Dehydrierungs-Additionsmechanismus beruht auf einer Michael-Addition eines nukleophilen Partners an ein in situ erzeugtes Chinon, wobei die Chinone als cyclische, ungesättigte Carbonylverbindungen noch reaktionsfähiger als kettenförmige α, β -ungesättigte Carbonylverbindungen sind (35). Die Addition erfolgt hierbei nach einem 1,4-Mechanismus, wobei sich die phenolische Struktur zurückbildet. Weinges und Mitarbeiter (36) formulierten einen derartigen Mechanismus für die Bildung von Dehydro-dicatechin A bei der fermentativen Oxidation von Catechin. Hierbei stellt der Ring B das aus dem Brenzcatechinderivat durch fermentative Oxidation hervorgegangene Chinon dar, während der Phloroglucin-Ring A eines anderen Catechin-Moleküls als nukleophiler Partner fungiert.

Bei unseren Untersuchungen der fermentativen und nichtfermentativen Oxidation von Myricitrin und Myricetin stellten wir fest, daß die Oxidation in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten erfolgt. Im ersten Reaktionsschritt dürfte ein Chinon gebildet werden, wenn auch alle Versuche, ein stabiles Derivat davon herzustellen, mißlingen. Dies wird besonders durch die zu Beginn der Oxidation auftretende rote Farbe gestützt. Nur kann sich im Falle des Myricitrinchinons kein weiteres Myricitrinmolekül in Form eines Carbanions im

Ring B in einer 1,4-Addition anlagern, da diese Stelle bereits durch den Chromonylrest besetzt ist. Jedoch muß der zweite Schritt in einer Dimerisierung liegen, wobei wir nicht sicher sind, ob auch im glykosidischen Oxidationsprodukt die phenolische Struktur, wie sie nach der Hydrolyse vorliegt, zurückgebildet wird. Diese Stabilisierungsreaktion wird nicht mehr enzymatisch katalysiert und kann zu verschiedenen Reaktionsprodukten führen. Eine Tropolonbildung, wie sie für Pyrogallol und Gallussäure gefunden wurde, ist nicht anzunehmen, da nach den Untersuchungen von Horner und Dürckheimer (21) aufgrund der Anordnung und des Charakters der Substituenten im B-Ring die Bildung eines Purpurgallinderivates nicht möglich ist. Es ist demnach wahrscheinlich, daß hierbei radikalische Produkte auftreten. Daß es sich bei dem Zwischenprodukt um ein einfaches 2',2''-dimeres Myricitrin handelt, ist nicht sicher, weil es nicht mehr die Eigenschaften eines polyhydroxylierten, glykosidischen Phenols zeigte; denn es ließ sich weder acetylieren noch methylieren. Auch das UV-Spektrum wies nicht den für Flavonole typischen Verlauf auf.

Auffallend ist auch die relativ große Stabilität des Produktes gegenüber weiteren Zusätzen von Peroxidase- H_2O_2 . Diese Eigenschaft könnte man allerdings auch auf sterische Einflüsse zurückführen, die das Ende von Polymerisationsreaktionen bestimmen können. Denkbar wäre bei dem Zwischenprodukt eine Diphenochinon-Struktur, die sich aber experimentell nicht beweisen ließ. Sie würde in einigen Fällen die ungewöhnlichen Eigenschaften dieses Produktes erklären. Nach Abspaltung des Zuckers entsteht dann das 2',2''-Bimyriceitin.

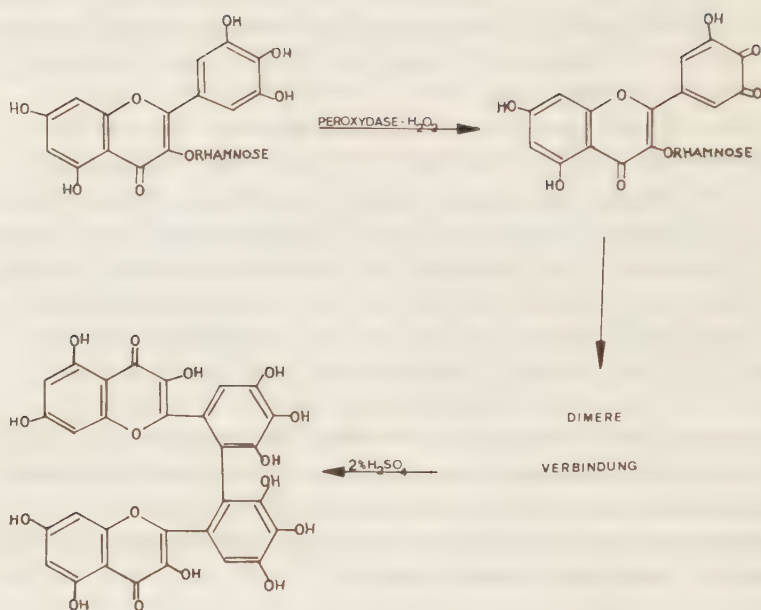
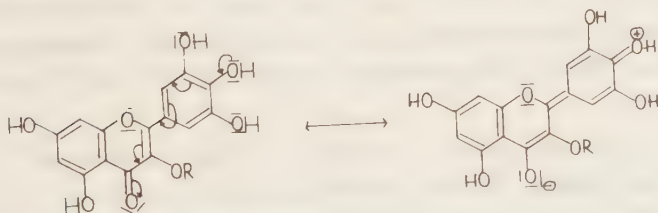


Abb. 33: Reaktionsschema der Bildung von 2',2''-Bimyricetin

Andere Autoren erhielten ein 2',2''-Bimyricetin bei ihren Oxidationsversuchen. So stellten Takino und Imagawa (37) fest, daß diese Verbindung als Hauptprodukt sowohl bei der enzymatischen Oxidation von Myricitrin mit Polyphenoloxidasen in Gegenwart von Catechin oder Brenzcatechin als auch bei der Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-III entstand. Der Strukturbeweis erfolgte hier durch Alkalischmelze des methylierten Produktes, wobei eines der Abbauprodukte nach der Entmethylierung mit Jodwasserstoffsäure Ellagsäure ergab.

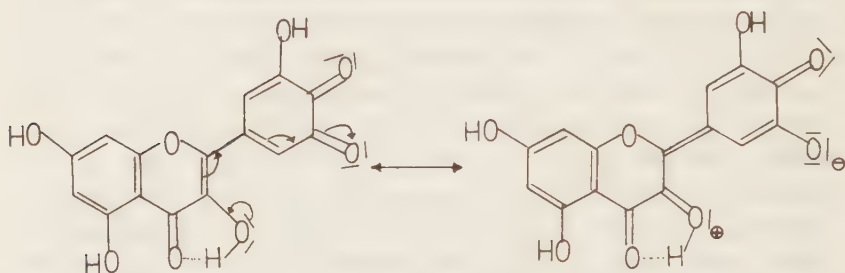
2. Redoxpotentiale

Durch Ermittlung der "Redoxpotentiale" sollten die von uns nachgewiesenen Chinone durch Vergleich mit anderen Chinonen näher charakterisiert werden. Das Redoxpotential gibt das Oxidationsvermögen des Chinons bzw. das Reduktionsvermögen des Hydrochinons an. Als Bezugspunkt für unsere Betrachtungen soll das o-Benzochinon/Brenzcatechin-System dienen, für das in dem von uns verwendete Lösungsmittelgemisch ein Redoxpotential von 812 mV gefunden wurde. Substituenten erhöhen oder erniedrigen dieses Redoxpotential. So setzten die ortho- und para-dirigierenden Substituenten mit einem +M-Effekt das Redoxpotential herab. Ein Beispiel dafür ist das Pyrogallol, bei dem die OH-Gruppe in ortho-Stellung eine Potentialerniedrigung von 83 mV bewirkt. Durch meta-dirigierende Substituenten mit einem -M-Effekt wird das Redoxpotential gegenüber dem unsubstituierten Brenzcatechin erhöht. Beispielsweise zeigen Nitrogruppen, Carboxylgruppen, aber auch der Chromonylrest solche Effekte. Der Einfluß des Chromonylrestes soll am Beispiel des Myricitrins durch folgende mesomere Grenzstrukturen verdeutlicht werden.



Ist im Chromonylrest in 3-Stellung eine freie OH-Gruppe, so muß entsprechend dem +M-Charakter dieses Substituenten das Potential gegenüber dem des Myricitrin erniedrigt sein, während die Rhamnosyloxygruppe ein schwächerer Elektronenlieferant ist.

Wir ermittelten für Myricetin eine Verschiebung um etwa 50 mV zum negativen Bereich. Das wird verständlich, da durch die Resonanzmöglichkeit der elektronenziehende Effekt des Chromonylrestes herabgesetzt wird.



Diese OH-Gruppe in 3-Stellung weist nicht dieselbe Stärke des Einflusses wie die 5'-OH-Gruppe in Nachbarstellung zum Diphenol auf; aber auch Horner und Geyer (27) beobachteten, daß Substituenteneinflüsse keine universellen Konstanten sind. Die 3-OH-Gruppe schwächt den -M-Effekt des Chromonylrestes ab.

Für das 2',2''-Bimyricetin wurde ein "Redoxpotential" von +743 mV gefunden. Dieses Potential liegt folglich nur um etwa 20 mV negativer als das der monomeren Verbindung. Das Meßergebnis ist im Falle des Bimyricetins mit einem systematischen Meßfehler behaftet, da die Verbindung oberhalb von $R = 1$ nicht vollständig oxidiert wurde, denn die gemessenen Werte liegen deutlich tiefer als die theoretisch berechnete Kurve (s. S. 71). Man kann daher sagen, daß die dimere Verbindung annähernd dasselbe Potential aufweist wie Myricetin. Der Grund dafür dürfte darin liegen, daß das Molekül aus

räumlichen Gründen nicht planar angeordnet ist, so daß keine weiteren Mesomerie-Effekte hinzutreten, die das Potential dieser Verbindung merklich verändern.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die vermessenen Stoffe die Chinonstufe durchlaufen, da der Verlauf der aus den Meßpunkten zu zeichnenden Kurven die Nernstsche Gleichung befolgt. Die Titrationskurven verlaufen jedoch alle flacher als die theoretisch berechneten. Diese Tatsache kann auf Lösungsmiteleinflüsse zurückgeführt werden. Erwartungsgemäß fanden wir sowohl für das Myricetin als auch für das Myricitrin ein niedrigeres Redoxpotential als für die entsprechenden Verbindungen mit einer Dihydroxygruppe am B-Ring. Dieses hohe Redoxpotential dürfte auch einer der Gründe dafür sein, daß das Myricitrin durch Ag_2O nicht angegriffen wird, da das Redoxpotential dieser Verbindung unterhalb des Myricitrins liegt.

E. Durchführung der Versuche

1. Allgemeine Angaben

Schmelzpunkte:

Die angegebenen Schmelzpunkte wurden mit der Apparatur nach Lindström ermittelt und sind unkorrigiert.

UV-Spektren:

Die UV-Spektren wurden mit dem Zeiss-Photometer M4/QII in den jeweils angegebenen Lösungsmitteln aufgenommen. Es wurden Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke verwendet.

IR-Spektren:

Die IR-Spektren wurden mit dem Perkin-Elmer-Spektralphotometer 237 in Kaliumbromid gemessen.

NMR-Spektren:

Die NMR-Spektren wurden mit dem Varian-60A-Gerät aufgenommen, wobei das jeweils angegebene Lösungsmittel verwendet wurde und Tetramethylsilan als innerer Standard diente.

Massenspektren:

Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer CH5 der Firma Krupp-Atlas aufgenommen.

Molekulargewichte:

Die Molekulargewichte wurden mit einem Mechrolab Vapor Pressure Osmometer 301 A in den angegebenen Lösungsmitteln ermittelt.

Analysen:

Die Mikroanalysen wurden von J. Beetz, Kronach/OFR und zum Teil von Herrn Prochnow im Pharmazeutischen Institut ausgeführt.

Dünnschicht-Chromatographie:

Es wurden Platten von 20 x 20 cm Größe benutzt. Die Beschichtung erfolgte mit einem Streichgerät nach Stahl (Desaga) Schichtdicke ca. 0,25 mm.

- Adsorbentien: 1. Kieselgel HF₂₅₄ mit 5 proz. Komplexon
2. Polyamid Woelm DC mit 1 g löslicher Stärke auf 15 g Adsorbens
3. MN-Cellulose-Pulver 300 G, "Macherey, Nagel & Co."

Laufhöhe 15 cm (Kammersättigung)

Die Erkennung der Flecke erfolgt:

- a durch Fluoreszenz (bei den methylierten Verbindungen)
- b durch Ansprühen mit methanolischer AlCl_3 -Lösung (bei nicht substituierten Flavonen)
- c mit wäßriger FeCl_3 -Lösung.

Papierchromatographie des Zuckers:

Aufsteigende Methode, Papier Whatman No I

Als Laufmittel diente Aethylacetat-Pyridin:

H_2O (7:3:2) (v/v/v)

Sprühreagenz: 0,2 M Anilinphthalat-Lösung.

2. Darstellung und Reinigung der Substanzen

Myricitrin = Myricetin-3-rhamnosid

200 g feingemahlene Rinde von *Myrica nagi*^{*)} wurden bei Zimmertemperatur 3 mal jeweils einen Tag lang mit 500 ml Methanol ausgezogen. Von dem unlöslichen Rückstand wurde abgepreßt. Der Extrakt wurde am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Es wurden 20 g Trockenextrakt gewonnen, aus dem durch häufiges Umkristallisieren aus Wasser Myricitrin isoliert wurde. Ausbeute 10,7 g.

Fp.: 195 - 196°

Elementaranalyse: $C_{21} H_{20} O_{12} \cdot 2H_2O$

Ber.: C:50,0 % H:4,41 % Gef.: 051,78 % H: 4,73 %

Myricetin = 3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavon

1 g Myricitrin wurde in 100 ml 2 proz. Schwefelsäure im siedenden Wasserbad eine Stunde lang erhitzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 5° C wurde das ausgefallene Myricetin abfiltriert und mehrmals mit Wasser nachgewaschen. Man erhielt gelbe Kristallnadelchen, die oberhalb von 350° unter Zersetzung schmolzen.

Ausbeute: 610 mg (96 %)

Berechnet: 318

Gef.: Mol.Gew. 318 (Massenspektrum)

2',2''-Bimyriceitin

a) Schwefelsäure Hydrolyse

2 g Oxidationsprodukt, durch fermentative Oxidation mit Peroxidase- H_2O_2 erhalten, wurde im siedenden Wasserbad zwei Stunden lang unter Rückfluß in 50 ml 2 proz. Schwefelsäure erhitzt. Nach eintägigem Stehen im Kühlschrank wurde das ausgefallene Produkt abfiltriert und mehrmals aus Wasser

^{*)} Wir danken Herrn Prof. Fa-Ching Chen von der Universität, Formosa, für die freundliche Überlassung von 2 kg getrockneter Rinde.

umkristallisiert.

Ausbeute: 0,4 g

b) Glykosidspaltung mit BBr_3

1 g glykosidisches Oxidationsprodukt wurde in 50 ml Methylenchlorid (Pentan) suspensiert und auf -40°C abgekühlt; dann wurde sofort mit 25 g Bortribromid (ebenfalls auf -40°C abgekühlt) versetzt. Unter Feuchtigkeitsausschluß wurde der Ansatz anfangs 1 Stunde bei dieser Temperatur belassen und dann langsam unter ständigem Rühren auf Zimmertemperatur erwärmt. Nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden wurde die Suspension scharf abgesaugt. Der Filtrerrückstand wurde mehrmals mit Methylenchlorid (Pentan) nachgewaschen und häufig aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 0,12 g

Elementaranalyse: $\text{C}_{30} \text{H}_{18} \text{O}_{16} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Ber.: C: 53,7 % H: 3,52 % Gef.: C: 54,2 % H: 3,76 %

Dodecamethylbimyricetin-2',2''

Zu einer Lösung von 0,63 g (1 mmol) 2',2''-Bimyricetin in 20 ml Methanol wurden 100 ml einer ca. 0,1 M aetherischen Diazomethan-Lösung gegeben. Nach dreistündiger Reaktionszeit wurde der Überschuß an Diazomethan mit einigen Tropfen Eisessig entfernt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der verbleibende Rückstand 24 Stunden lang über P_2O_5 im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet. Zu der Lösung des Rückstandes in 20 ml Aceton wurden 2 g frisch geglühtes Kaliumcarbonat und 0,2 ml frisch destilliertes Dimethylsulfat gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 8 Stunden lang unter Rückfluß erhitzt. Man saugte dann heiß vom Kaliumcarbonat ab, das mehrmals mit siedendem Aceton nachgewaschen wurde. Nach Zugabe von 10 ml Wasser und 1 ml 10 proz. Ammoniak-Lösung wurde der Ansatz unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Das erhaltene Produkt wurde anschließend mehrmals aus Methanol umkristalli-

siert.

Ausbeute: 0,5 g (62 %)

Fp.: 231°

Elementaranalyse: $C_{42} H_{42} O_{16}$

Ber.: C: 62,84 % H: 5,27 % Gef.: C: 62,36 % H: 5,20 %

OCH_3 : Ber.: 46,38 % Gef.: 44,07 %

Mol.Gew.: 799; 797 ($CHCl_3$)

3,3',4',5,5',7-Hexamethylmyricetin

0,5 g (1,5 mMol) Myricetin, 20 ml Aceton, 2 g frisch geglähtes Kaliumcarbonat und 0,5 ml frisch destilliertes Dimethylsulfat wurden 8 Stunden am Rückfluß erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei Dodecamethylbimyricein-2',2'''. Aus Methanol erhielt man farblose Kristalle.

Ausbeute: 0,4 g (69 %)

Fp: 156 - 157° (Liter. 154 - 156°)

Elementaranalyse: $C_{21} H_{22} O_8$

Ber.: C: 62,68 % H: 5,51 % Gef.: C: 62,83 % H: 4,98 %

OCH_3 : Ber.: 46,26 % Gef.: 42,35 %

Mol.Gew.: 406; 408 ($CHCl_3$)

Myricetinchinon

Eine Suspension von 0,32 g Myricetin in 50 ml absoluten Äther wurden mit 0,7 g frisch bereitetem getrocknetem Silberoxid und wasserfreiem Natriumsulfat eine halbe Stunde lang unter Feuchtigkeitsausschluß geschüttelt. Dann wurde rasch über eine mit Natriumsulfat beschichtete Glasfritte abgesaugt. Die rote Lösung wurde auf etwa 10 ml eingeeengt und mit der gleichen Menge Petroläther versetzt. Man kühlte die Lösung zur Kristallisation in einer Kohlensäureschnee-Aceton-Mischung auf -60° ab. Das schwarze Kristallisat wurde abgesaugt und in einem Exsikkator über P_2O_5 aufbewahrt. Ein

Schmelzpunkt konnte nicht ermittelt werden, da sich die Substanz beim Erwärmen auf 120° zersetzte, aber nicht schmolz.

Rutin (Quercetin-3-rutinosid)

Da das im Handel erhältliche Rutin purum "Merck" mit einigen phenolischen Stoffen, insbesondere mit Quercetin, verunreinigt ist, mußte es für die potentiometrischen Messungen gereinigt werden. Hierzu wurden 10 g Rutin mit 50 ml Aceton eine halbe Stunde lang rückfließend erhitzt, es wurde heiß vom Rutin abgesaugt und der Niederschlag mehrmals mit siedendem Aceton nachgewaschen. Anschließend wurde mehrmals aus 50 proz. Aethanol umkristallisiert. Rutin wurde im Exsikkator über Blaugel getrocknet. Hierbei konnte man sicher sein, daß das trockene Produkt 3 Mole Kristallwasser enthielt(38).

Mol.Gew. für $C_{27} H_{30} O_{16} \cdot 3H_2O$: 664,59

Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon)

5 g Rutin (Merck) wurden mit 250 ml 2 proz. Schwefelsäure eine Stunde lang am Rückflußkühler erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz 24 Stunden in den Kühlschrank gestellt. Das ausgefallene Quercetin wurde auf einer Glasfritte gesammelt, mit Wasser gewaschen und mehrmals aus 80 proz. Aethanol umkristallisiert. Für die potentiometrischen Messungen wurde die Substanz vorher in der Trockenpistole bei $105^{\circ} C$ über P_2O_5 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Sonstige Substanzen

Pyrogallol, Gallussäure und Gallussäureaethylester wurden als Reinsubstanzen von der Fa. Merck bezogen.

3. Enzyme

Peroxidase (POD)

Die für die Oxidationsversuche verwendete Peroxidase wurde als gereinigtes Lyophilisat von der Firma Boehringer bezogen. Die Aktivität wurde nach der Chance-Maechly-Methode (39) bestimmt. Für die Aktivitätsbestimmung wird die Geschwindigkeit der Farbstoffbildung bei der POD-katalysierten Oxydation von Guajakol mit H_2O_2 gemessen. Aus der ermittelten Extinktionszunahme pro Zeiteinheit und aufgrund der bekannten Geschwindigkeitskonstanten wurde der Gehalt an aktiver POD errechnet. Es ergab sich ein Gehalt von

$$3,92 \cdot 10^{-9} \text{ Mol aktives POD/mg Lyophilisat.}$$

Bei den Oxidationsversuchen wurde bei einem Ansatz, der 1 mMol Substrat enthielt, 5 ml Peroxydase-Lösung verwendet (1 mg POD/ml).

Cellulase 2000 E/g

Die für die Hydrolyseversuche verwendete Cellulase wurde von der Firma Merck bezogen. Für die Ansätze wurden bei einer Menge von 200 mg glykosidischer Substanz 100 mg Cellulase verwendet, die in 10 ml Phosphat-Puffer pH 5,2 suspendiert wurden. Die Ansätze wurden bei $30^{\circ}C$ inkubiert und anschließend mit wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt.

4. Oxidationsversuche

1 g Myricitrin (= 2 mMol) wurden in 10 ml gereinigtem Methanol gelöst und mit destilliertem Wasser auf 500 ml verdünnt. Die Lösung wurde mit 20 ml 0,1 M- H_2O_2 -Lösung (= 2 Val) versetzt. Unter Rühren ließ man 10 ml Peroxidase-Lösung zutropfen. Die Lösung färbte sich an den Eintropfstellen braun und ging dann in eine olivgrüne Farbe über. Nach vollständiger Dehydrierung von Myricitrin, ungefähr nach einer Stunde, wurde der Ansatz lyophilisiert.

Ausbeute: 1 g gelbes voluminöses Lyophilisat

Bei den Ansätzen mit 3, 4 und 6 OxVal wurden 30, 40 und 60 ml einer 0,1 M- H_2O_2 -Lösung hinzugesetzt. Für die photometrischen Messungen wurde die Lösung 1:100 mit destilliertem Wasser im Meßkolben verdünnt.

5. Reduktionsversuche

88 mg (500 μMol) Ascorbinsäure wurden in Wasser auf 100 ml gelöst. Je 5 ml dieser Lösung wurden in Reagenzgläser gefüllt. Zur Reaktion gebracht wurden: 10 ml einer Lösung von Myricitrin, die 100 μMol pro Liter in 2 proz. Schwefelsäure enthielt und 20 ml einer Ce(IV)-sulfat-Lösung (200 $\mu\text{Mol/l}$). In Abständen von 20 sec. wurden dem Reaktionsansatz jeweils 5 ml entnommen und mit 5 ml Ascorbinsäure-Lösung gemischt, wobei sich die Ascorbinsäure im Überfluß befand. Von den einzelnen Ansätzen wurde die Extinktion bei 350 nm bestimmt.

6. Additionsversuche mit Benzolsulfinsäure an Myricetin-chinon

in Lösung

0,6 g Myricetin wurden in einer Mischung von 30 ml Methanol, 30 ml Eisessig und 1 ml Dioxan gelöst. Dieser Lösung wurden unter ständigem Rühren bei Zimmertemperatur einige Tropfen KJO_3 -Lösung und sofort ebenfalls einige Tropfen methanolische Benzolsulfinat-Lösung (10 proz.) hinzugefügt. Es entstand anfangs eine tiefrote Lösung, die sich langsam nach orangerot verfärbte. Der Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Anschließend wurde der Ansatz in eine eisgekühlte Natriumbisulfit-Lösung eingegossen. Die Lösung wurde mehrmals mit Äther ausgeschüttelt.

F. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Oxidation von Myricitrin und Myricetin.

1. Die Ausgangsverbindung, das Myricetin-3-rhamnosid, wurde aus der getrockneten Rinde von *Myrica nagi* isoliert. Die Oxidationsversuche wurden mit Peroxidase- H_2O_2 sowie Cer(IV)-sulfat, Silberoxid und Kaliumjodat durchgeführt. Bei der fermentativen Oxidation entsteht über das Chinon ein stabiles Produkt. Versuche, die zur Aufklärung der Struktur dieses Produktes führen sollten, schlugen fehl. Bei der sauren Hydrolyse dieser Substanz bildet sich ein Produkt, das ein Dimeres des Myricetins darstellt.

Zur Strukturauflklärung dieses Oxidationsproduktes wurde dieses methyliert und die Struktur des permethylierten 2',2''-Bimyricetins durch Elementaranalyse, Molekulargewicht, IR- und NMR-Spektren bewiesen.

2. Die bei der Oxidation zwischenzeitlich auftretenden sehr instabilen Chinone konnten spektralphotometrisch nachgewiesen werden. Während sich das Myricetinchinon durch seine sehr intensiv rote Farbe zu erkennen gibt, konnte die Entstehung von Myricitrinchinon nur durch seine Reduzierbarkeit mit Ascorbinsäure unter Rückbildung von Myricitrin nachgewiesen werden.

3. Durch Messung der Redoxpotentiale instabiler Systeme unter Verwendung der Strömungsapparatur von Chen, Ball und Clark (30) konnte ebenfalls nachgewiesen werden, daß Myricetin, Myricitrin sowie das dimere Oxidationsprodukt intermediär Chinone bilden. Zur Testung der Meßanordnung wurden neben diesen Verbindungen Pyrogallol und einige Derivate des Pyrogallols sowie Quercetin und Rutin eingesetzt.

In einer Mischung aus 30 % Dioxan und 70 % 5proz. Schwefelsäure wurden folgende "Normalpotentiale" ermittelt:

Myricetin +763 mV, Myricitrin +812 mV, dimeres Myricetin + 743 mV, Quercetin +755 mV, Rutin +879 mV, Pyrogallol

+729 mV, Gallussäure +814 mV und Gallussäureaethylester +828 mV.

4. Es werden die Möglichkeiten der Dimerisierung des Myricetinchinons diskutiert. Eine 1,4-Addition, wie sie häufig für die Dimerisierung von Benzochinonderivaten gefunden wird, sowie eine Tropolonbildung werden ausgeschlossen. An der Dimerisierung sind wahrscheinlich radikalische Zwischenstufen beteiligt. Da die Struktur des glykosidischen Oxidationsproduktes nicht bekannt ist, kann ein genauer Mechanismus nicht angegeben werden. Der Unterschied im Oxidationsverhalten der hier untersuchten Verbindungen wird erörtert. Im Vergleich zu den 3',4'-Dihydroxyflavonolglykosiden weisen die 3',4',5'-Trihydroxyflavonolglykoside ein niedrigeres Redoxpotential auf. Diese Erscheinung ist auf die zusätzliche 5'-OH-Gruppe mit einem elektronenschiebenden Effekt zurückzuführen.

Quercetin und Myricetin, die beide eine freie 3-Hydroxylgruppe besitzen, weisen etwa das gleiche Redoxpotential auf. Demnach scheint der elektronenliefernde Effekt einer OH-Gruppe in 3-Stellung praktisch ebenso groß zu sein wie der von zwei Hydroxylfunktionen in 3- und 5'-Position.

G. Literaturverzeichnis

- (1) FREUDENBERG, K.: Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe, Springer-Verlag, Berlin 1920
- (2) BAKER, W.,
FINCH, A.C.M.,
OLLIS, W.D.,
ROBINSON, K.W.: J. Chem. Soc. 1963, 1477 (;963)
- (3) MURTI, V.V.S.,
RAMAN, P.V.,
SESHADRI, F.R.: Tetrahedron 23, 397 (1967)
- (4) Pelter, A., WARREN, R.
ILGAS, M.: Experientia 25 (4), 350-1 (1969)
- (5) SAWADA, T.: J. Pharm. Soc., Japan 78, 1023 (1958)
- (6) LOTH, H.: Arch. Pharm. 295, 161 (1962)
Arch. Pharm. 295, 115 (1962)
- (7) LOTH, H., D. KLINGE: Arch. Pharm. 297, 165 (1964)
- (8) HEINRICI, K.-G. Diss., Freie Universität Berlin (1966)
- (9) DIEDRICH, K.: Diss., Freie Universität Berlin (1967)
- (10) SHIMIZU, M., G. OHITA,
YOSHIKAWA, T.,
KASAHARA, A.: C. A. 47, 2758 (1953)
- (11) HÄNSEL, R.,
HÖRHAMMER, L.: Arch. Pharm. 117 (1954)
- (12) JURD, L.: In "The Chemistry of Flavonoid Compounds" (T. A. Geissmann Ed.), S. 107-155
Pergamon Press, Oxford 1962
- (13) BELLAMY, L. J.: In "Ultrarot-Spektrum und Chemische Konstitution", 2. Auflage, Verlag Dr. D. Steinkopff, Darmstadt (1966)
- (14) AUDIER, H.: Bull. Soc. chim. 9, 2892 (1966)
- (15) MABRY, T.J., J. KAGAN,
RÖSLER, H.: Sonderdruck aus dem Department of
Bolong and Cellresearch Institute
The University of Texas, Austin
(1965)

- (16) McOMIE, I.F.V.V., Chem. & Ind. (London) 41 , 1658
WALT, M.L.: (1963)
- (17) SCHWABE, H.: Diss., ETH Zürich, Diss Nr. 3979,
S. 75 (1967)
- (18) FÄHRAEUS, G.: In Handbuch der Pflanzenphysiolo-
gie Bd. IV, Springer-Verlag 1958
- (19) KUHN, R., J. LÖW,
TRISCHMANN, H.: Chem. Ber. 88, 1492 (1955)
- (20) NEEMAN, M.,
HASHIMOTI, J.: Am. Soc. 84, 2972 (1962)
- (21) HORNER, L.,
DÜRCKHEIMER, W.: Z. Naturforsch. 14b, 741 (1959)
- (22) HORNER, S. GÖWECKE: Chem. Ber. 94, 1267 (1961)
- (23) WILLSTÄTTER, R.,
PFANNENSTIEL, A.: Ber. dtsh. chem. Ges. 37, 4744
(1904)
- (24) TEUBER, H.-J.,
STAIGER, G.: Chem. Ber. 88, 802 (1955)
- (25) HINSBERG, O.
HIMMELSCHIN, A.: Ber. dtsh. chem. Ges. 29, 2023
(1896)
- (26) ROBERTS, E.A.H.: Chem. & Ind. (London) 1959, 995
(1959)
- (27) HORNER, L., E. GEYER: Chem. Ber. 98, 2016 (1965)
- (28) FIESER, L.F.: J. Amer. chem. Soc. 52, 4915
(1930)
- (29) FIESER, L.F.,
PETERS, M.A.: J. Amer. chem. Soc. 53, 793
(1963)
- (30) BALL, E.G., T.T. Chen, J. biolog. Chemistry 102, 691
CLARK, W.M.: (1933)
- (31) JANDER, G., K.F. Jahr In "Maßanalyse", Sammlung Götschen
KNOLL, H.: Bd. 221/221a
Walter de Gruyter Verlag, Berlin
1966
- (32) STACKELBERG, M. v.: In "Methoden der organ. Chemie"
(Houben Weigl) Bd. III₂, S. 255,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- (33) BATES, R.G.: "Elektrometric pH Determination",
J. Wiley & Sons,
Inc. New York 1953

- (34) CLARK, W.M.: "Oxidation - Reduction Potentials of Organic Systems", S. 363, William and Wilkins Company, Baltimore 1960
- (35) WANZLICK, H.W.: In "Neure Methoden der präparativen Organischen Chemie" Bd. IV, S. 126, herausgegeben von W. Först, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1966
- (36) WEINGES, K., W.EBERT, D. HUTHWELKER, H. MATTAUCH, J.Perner: Liebigs Ann. Chem. 726, 114 - 124 (1969)
- (37) TAKINO, J., H. IMAGAWA: Agr. Biol. Chem. Tokyo 26, 541 (1962)
- (38) HALTORI, S.: In "The Chemistry of Flavonoid Compounds" (T.A. Geissmann Ed.), S. 317 Pergamon Press Oxford 1962
- (39) CHANCE, B., A.G. MAHLY: In "Methods of Enzymology" Bd. II, S. 770 Accid. Press New York 1955

Lebenslauf

Am 12. April 1939 wurde ich als Tochter des Diplom-Kaufmanns Joseph Lang und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Hurlebusch, in Berlin geboren. Meine Schulzeit verbrachte ich in Mannheim und Berlin; im März 1959 bestand ich am Gertrauden-Gymnasium in Berlin-Dahlem das Abitur.

Von April 1959 an war ich als Apothekerpraktikantin in der "Dr. Cadors-Apotheke" in Berlin-Wedding tätig und bestand im Frühjahr 1961 das pharmazeutische Vor-examen. Zum Sommersemester 1962 nahm ich das Pharmaziestudium an der Technischen Universität Berlin auf, welches ich ab Sommersemester 1963 an der Freien Universität Berlin fortsetzte und im Mai 1965 mit bestandenem Staatsexamen abschloß.

Im Anschluß an das Staatsexamen wurde ich wissenschaftliche Hilfsassistentin am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin und erhielt im Juni 1965 von Herrn Professor Dr. H. Loth das Thema zu meiner Dissertation. 1967 erlangte ich die Approbation als Apothekerin. Im Herbst 1968 wurde ich mit der Wahrnehmung der Geschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten beauftragt.

Seit November 1969 bin ich als Apothekerin am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin tätig.

